Aus dem Institut für Toxikologie der
Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. H. Remmer

Enzymkinetische Untersuchungen zur mikrosomalen Barbiturat-Hydroxylierung und ihrer Hemmbarkeit durch Äthanol

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Franz Ludwig Münch
aus Laupheim

1978

Aus dem Institut für Toxikologie der
Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. H. Remmer

Enzymkinetische Untersuchungen zur mikrosomalen Barbiturat-Hydroxylierung und ihrer Hemmbarkeit durch Äthanol

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Franz Ludwig Münch
aus Laupheim

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. med. H. J. Mallach
1. Berichterstatter: Professor Dr. med. Dr. rer. nat. R. Schüppel
2. Berichterstatter: Professor Dr. med. H. Remmer
Korreferat: Professorin Dr.rer.nat. Dr. med. U. Breyer-Pfaff

Inhaltsverzeichnis

Theoretischer Teil

1.1. Einleitung..... 1
1.2. Pathogenese der Kombinations-Wirkungen..... 3
1.3. Die pharmakokinetische bedingte Interferenz..... 4
1.4. Beeinflussung der Pharmakokinetik von Arzneimitteln durch Äthanol..... 5
1.5. Arznei- und Fremdstoffwechsel und seine Störung durch Äthanol..... 6
1.6. Die Kombination von Barbituraten und Äthanol.....10
1.7. Fragestellung der vorliegenden Arbeit und allgemeines methodisches Vorgehen.....14
1.7.1. Mikrosomale Hexobarbital-Hydroxylierung in vitro.....16
1.7.2. Mikrosomale Pentobarbital-Hydroxylierung in vitro.....16
1.7.3. Vergleichender Hemmversuch unter identischen Bedingungen.....17
1.8. Ergebnisse.....17
1.8.1. Versuche mit Hexobarbital.....18
1.8.2. Versuche mit Pentobarbital.....18
1.8.3. Vergleichender Hemmversuch unter identischen Bedingungen.....19
1.8.4. Tabelle der ermittelten enzymkinetischen Parameter.....19
1.9. Besprechung der Ergebnisse.....21
1.10. Zusammenfassung.....25

Experimenteller Teil

2.1. Gewinnung von Rattenlebermikrosomen...36
2.1.1. Mikrosomenpräparation.....36
2.1.2. Proteinbestimmung.....36
2.2. Umsetzungen von Barbituraten in vitro.38
2.2.1. Inkubation von Hexobarbital.....38
2.2.1.1. Bestimmung von Hexobarbital nach BRODIE et al. (1953).....38
2.2.1.1.1. Prinzip der Methode.....38
2.2.1.1.2. Ausführung.....38
2.2.1.1.3. Pufferlösungen.....39
2.2.1.1.4. Reinigung des benützten Petroläthers..39
2.2.1.1.5. Referenz.....39
2.2.1.1.6. Eichkurve für die Hexobarbitalbestimmung.....39
2.2.1.2. Inkubationsansätze in vitro.....42
2.2.1.3. Auswertung.....43
2.2.1.3.1. Ermittlung der K_m- und V_{max}-Werte von Hexobarbital.....44
2.2.1.3.2. Ermittelter K_m- und V_{max}-Wert von Hexobarbital.....44
2.2.1.3.3. Äthanolhemmversuche.....44
2.2.1.4. Ergebnisse der Hexobarbitalinkubationen.....45
2.2.2. Inkubation von Pentobarbital.....49
2.2.2.1. Bestimmung von Pentobarbital nach BREYER und VILLUMSEN (1975).....49
2.2.2.1.1. Prinzip der Methode.....49
2.2.2.1.2. Ausführung.....49
2.2.2.1.3. Fließmittel.....51
2.2.2.1.4. Ermittlung der Peak-Flächen.....51

2.2.2.1.5. Eichkurven für die Pentobarbital-bestimmung.....51
2.2.2.1.5.1. Herstellung einer Standardlösung....51
2.2.2.1.5.2. Bestimmung des Pentobarbitalgehaltes der Standardlösung.....52
2.2.2.2. Inkubationsansätze in vitro.....53
2.2.2.3. Auswertung.....54
2.2.2.3.1. Berechnung der prozentualen Extraktion.....54
2.2.2.3.2. Ermittlung der K_m- und V_{max}-Werte von Pentobarbital.....55
2.2.2.3.3. Ermittelter K_m- und V_{max}-Wert von Pentobarbital.....55
2.2.2.3.4. Äthanolhemmversuche.....55
2.2.2.4. Ergebnisse der Pentobarbital-inkubationen.....56
2.2.3. Umsetzungen von Hexobarbital nach der Methode von BREYER und VILLUMSEN (1975).....62
2.2.3.1. Bestimmung von K_m und V_{max}.....62
2.2.3.1.1. Ermittelter K_m- und V_{max}-Wert.....62
2.2.3.1.2. Ergebnis (K_m u. V_{max}).....63
2.2.3.2. Äthanolhemmversuch von Hexobarbital mit niedriger Substratkonz. nach der Methode von BREYER u. VILLUMSEN.....63
2.2.4. Parallelverlaufender Hemmversuch mit Äthanol von Hexobarbital und Pentobarbital nach der Methode von BREYER und VILLUMSEN (1975) mit gleicher Substratkonzentration.....64
2.2.5. Linearität der Abbaurate von Hexobarbital und Pentobarbital innerhalb der benutzten Versuchsdauer.....66
2.3. Enzymatische Alkoholbestimmung der Ansätze in vitro.....67
3. Literaturverzeichnis.....70

1.1. Einleitung

Kombinationswirkungen zwischen Arzneimittel und Alkohol bilden gegenwärtig ein bedeutsames Problem der praktischen Arzneimittel-Toxikologie. (SOEHRING u. SCHÜPPEL 1966, FORNEY and HUGHES 1968, MEZEY 1976, POLACSEK et al. 1970 u. 1972, CALDWELL and SEVER 1974, SEIXAS 1975).
Ursache hierfür sind, in den sog. zivilisierten Ländern, der ständig zunehmende Alkohol-Genuß bzw. -Mißbrauch sowie der ebenfalls ständig steigende Konsum differenter Arzneimittel, insbesondere solcher aus der Gruppe der Tranquilizer, der Hypnotica und der Psychopharmaka im weiteren Sinne (ESTLER 1975). Neuerdings sind hierzu auch eine Anzahl von Rauschdrogen zu zählen, die keinen therapeutischen Zwecken dienen. Im Rahmen einer Polytoxikomanie kommt Alkohol seit jeher die Rolle einer "Basisdroge" zu. (z.B. BIERINGER et al. 1976, HOLLISTER et al. 1970, BATTEGAY et al. 1977).

Unter den hier skizzierten toxikologischen Aspekten sind Kombinationswirkungen in Verbindung mit Alkoholaufnahme seit langen eine Domäne der Gerichtlichen Medizin und Forensischen Toxikologie (WEINIG 1965). Inzwischen sind aber auf verschiedenen Therapiegebieten manifeste Kombinationswirkungen zwischen Alkohol und Arzneimitteln derart häufig geworden, daß auch der praktisch tätige Arzt und Therapeut sie beachten muß (MEYLER 1966, TORKA 1961, WAGNER 1963). Unter den derzeitigen epidemiologischen Verhältnissen muß bei jeder Arzneitherapie stets auch mit einer allfälligen - akuten bzw. chronischen - Alkoholbelastung des Patienten und einem dadurch erhöhten Risiko von unerwünschten bzw. gefährlichen Kombinationswirkungen gerechnet werden (BÜTTNER 1960, GOLDBERG 1965, KIENLE 1968, RUBIN and LIEBER 1971, KUSCHINSKY 1976).

Hier sind es vor allem die Fachgebiete der Neurologie und Psychiatrie, die auf Grund ihres spezifischen Arzneischatzes und ihrer Patienten-Klientel mit diesem Problem konfrontiert sind. Kombinationswirkungen dieser Art haben ferner Bedeutung in der ambulanten Allgemeinmedizin, der Unfallheilkunde, der Inneren Medizin (z.B. Hepatologie), der Arbeitsmedizin und der Anaesthesiologie (z.B. LAVES 1959, WAGNER u. WAGNER 1958). Weniger direkt spielen vermutete bzw. behauptete Wechselwirkungen im Gutachtenwesen für Rechtspflege und Versicherungsmedizin eine bedeutende Rolle (MALLACH 1968). In der Arbeits- und Verkehrsmedizin kommt den Kombinationseffekten und den mit ihnen verbundenen, möglichen Risiken für Arbeits- und Verkehrssicherheit ein besonderer Stellenwert zu. (WAGNER 1959 u. 1963, KIELHOLZ u. PÖLDINGER 1967, HAMACHER u. ZIPF 1967).

Gegenüber der praktischen Bedeutung, die derartige Kombinationswirkungen gewonnen haben, sind die pathogenetischen Vorstellungen und Kenntnisse über Wechselwirkungen dieser Art gegenwärtig (noch) höchst lückenhaft. Sehr bezeichnend ist in diesem Zusammenhang die Feststellung des Ausschusses für Verkehrsmedizin von 1964 (Zitat Dtsch. Ärzteblatt 1964, pg. 1348), demzufolge "es Kombinationseffekte gibt, die noch nicht zu übersehen sind".
Insgesamt fehlt ein tragfähiges, pathogenetisches Konzept, das die Vielfalt der Wechselwirkungen und Wirkungsbedingungen zu erkennen und zu interpretieren gestattet. Entsprechend sind auch die Möglichkeiten der Voraussage und damit der Prophylaxe sehr begrenzt: bisher ist sowohl der Arzt als auch der Gutachter auf die Interpretation der Kasuistik angewiesen.

1.2. Pathogenese der Kombinations - Wirkungen

Hier hat lange die Vorstellung dominiert, daß Kombinationseffekte zwischen Arzneimitteln und Alkohol ausschließlich auf der Ebene zentralnervöser Rezeptoren ausgelöst bzw. vermittelt werden, mit anderen Worten, daß hier eine pharmakodynamische Wechselwirkung vorliegt. (CARRIERE et al. 1934, AHLQUIST u. DILLE 1940, LICKINT 1957, KOPMANN et al. 1959, WEINIG u. SCHWERDT 1956).
Zur Beschreibung dieser Interferenzen wurden Begriffe des additiven bzw. überadditiven Synergismus (sog. "Potenzierung") herangezogen, die allerdings über den Wirkungsmechanismus wenig aussagen (LOEWE 1953, RAMSAY u. HAAG 1946, VELDSTRA 1956, GRUBER 1955).
Mit fortschreitender Analyse erwies sich aber ein ausschließlich pharmakodynamisches Konzept der Kombinationswirkungen als zu eng.
Durch die Fortschritte der Biochemie und chemischen Analytik haben auch biochemische und besonders pharmakokinetische Parameter für die Pathogenese von Kombinationswirkungen Beachtung gefunden (SOEHRING u. SCHÜPPEL 1966, WAGNER 1957). Speziell unter dem pharmakokinetischen Aspekt ergaben sich hier zwei komplementäre Problemstellungen, die für das Verständnis von Kombinationswirkungen wertvoll sind.
Es sind dies

a.) die Beeinflussung der Pharmakokinetik von Äthanol durch Arzneimittel,
b.) die Beeinflussung der Pharmakokinetik von Arzneimitteln durch Alkohol.

Hierbei hat sich ergeben, daß in beiden Fällen durch pharmakokinetische Interferenz - also auf der Ebene der Resorption, der Verteilung, des Stoffwechsels und der Elimination von Arzneistoffen wie von Äthanol - manifeste Kombinationswirkungen ausgelöst werden kön-

nen. (SOEHRING u. SCHÜPPEL 1966, COLDWELL et al. 1970 u. 1973, BESSERER et al. 1974, MEZEY 1976, WHITTLESEY and PHILIP 1954, MELVILLE et al. 1966).

1.3. Die pharmakokinetisch bedingte Interferenz

Unter Pharmakokinetik wird die Gesamtheit der Wirkstoff-Bewegung und -Umsetzung in einem Organismus verstanden, also im Besonderen die Vorgänge von Resorption, Verteilung, Stoffwechsel als Abbau oder Aktivierung und der Elimination. Die oben (s.1.2.) unter a.) genannte Alternative -Beeinflussung der Pharmakokinetik von Äthanol durch Arzneimittel - ist sehr eingehend experimentell untersucht worden. (ELBEL u. SCHLEYER 1956, WHITTLESEY and PHILIP 1954, WAGNER 1957, SEIDEL 1964, SEIDEL u. SOEHRING 1965).
Dabei wurde gefunden, daß Resorption und Verteilung von Alkohol im Körper durch Arzneistoffe praktisch nicht oder nicht gesetzmäßig beeinflußt werden. Auf der Stoffwechselebene können jedoch mit Arzneistoffen biochemische Wechselwirkungen auftreten. So kann die Äthanoloxidation durch ADH in der Leber durch Zn-Komplexbildner (z.B. Pyrazol und Derivate) deutlich gehemmt werden (KHANNA et al. 1974, GOLDBERG and RYDBERG 1969). Von praktisch verwendeten Arzneimitteln ist dies bisher nicht nachgewiesen worden. Eine Beschleunigung der Alkoholoxidation in vivo ist dagegen bisher lediglich durch Fructose nachgewiesen (TYGSTRUP et al. 1965). Die primäre Elimination des Alkohols - meßbar am Verlauf der Blutalkohol-Konzentration - ist also durch Arzneistoffe nicht regelhaft zu beeinflussen (ELBEL 1956, WALTER 1938).

Der zweite Schritt der Äthanol-Oxidation, die Umwandlung von Acetaldehyd zu Acetat, wird durch ver-

schiedene Fremdstoffe gestört, darunter auch Arzneimittel wie Nitroimidazole, Sulfonamid-Derivate u.a. (HALD et al. 1949, WAGNER 1957, BÜTTNER et al. 1961, PODGAINY and BRESSLER 1968). Die Hemmung der Acetaldehyd-Dehydrogenase führt zur Erhöhung der Acetaldehyd-Spiegel im Blut und Gewebe, was zu der als typisch angesehenen "Flush"-Symptomatik führen soll (JACOBSEN 1952).
An diesem Beispiel wurde erstmals eine manifeste Kombinationswirkung (z.B. Antabus - Alkohol) auf eine peripher (in der Leber) lokalisierbare, metabolische Interferenz zurückgeführt.

1.4. Beeinflussung der Pharmakokinetik von Arzneimitteln durch Alkohol

Das komplementäre Problem der Beeinflussung der Pharmakokinetik von Arzneimitteln durch akute oder chronische Alkoholbelastung ist erst in den letzten Jahren systematisch bearbeitet worden. Die Anzahl und Verschiedenartigkeit der dafür in Betracht zu ziehenden Arzneistoffe hat, zusammen mit methodischen-analytischen Problemen, diese Forschungen lange behindert.

Es konnte durch Untersuchungen in vivo als auch in vitro nachgewiesen werden, daß Äthanol - bei akuter Gabe - die metabolische Elimination von Arznei- und Fremdstoffen selektiv stören kann; Äthanol und andere aliphatische Alkohole wurden als Inhibitor einer der Hauptreaktionen des Arzneistoffwechsels erkannt (SOEHRING u. SCHÜPPEL 1966, SCHÜPPEL et al. 1967, RUBIN and LIEBER 1968, SCHÜPPEL 1968/1969a/1969b/1969c/1971a/1971b, RUBIN et al. 1970a/1970b, PETRUCH u. SCHÜPPEL 1971, COHEN and MANNERING 1973). Auf diesem Wege kann Äthanol für bestimmte Arznei-

stoffe eine mehr oder weniger ausgeprägte Störung des pharmakokinetischen Verhaltens auslösen, die unter Umständen zu manifesten Kombinationswirkungen führt.
Andere Teilfunktionen der Pharmakokinetik, wie Resorption, die primäre Verteilung oder renale Elimination, scheinen - soweit bis heute bekannt - durch Alkohol nicht direkt beeinflußt zu werden. Etwaige nachweisbare Störungen auf dieser Ebene sind als Folge der primär metabolischen Störung im Arzneistoffwechsel aufzufassen (SEIDEL 1967, SCHÜPPEL 1969 a/b/c).

1.5. Arznei- und Fremdstoffwechsel und seine Störung durch Alkohol

Die verschiedenen therapeutisch und diagnostisch benutzten Arznei- und Wirkstoffe unterliegen im Körper einem z.T. eingreifenden biochemischen Um- bzw. Abbau. Durch die sog. Biotransformation werden überwiegend lipophile Substanzen vermehrt hydrophil und damit nierengängig bzw. ausscheidungsfähig. Das Hauptorgan des Fremdstoffwechsels stellt die Leber dar. Der Arzneistoffwechsel läuft, ungeachtet der strukturell-chemischen Vielfalt der Arzneistoffe, in relativ wenigen, stereotypen Reaktionswegen ab: sie umfassen -neben einigen weniger bedeutsamen Typen - zur Hauptsache

1.) hydrolytische
2.) hydroxylierende
3.) konjugierende Reaktionen.

(REMMER 1966/1967, BRODIE and GILLETTE 1971).
Insbesondere die hydroxylierende Reaktionen sind durch mangelnde Spezifität ihrer Substrat-Anforderungen vor allen übrigen Enzymreaktionen ausgezeichnet: damit kommt ihnen eine fast universelle

Aktivität gegenüber allen aufgenommenen, lipophilen Fremdstoffen zu. Daraus ergibt sich die umfassende Bedeutung dieses Reaktionstyps im gesamten Arznei- und Fremdstoffwechsel (REMMER 1969).

Äthanol und andere aliphatische Alkohole hemmen - bei akuter Einwirkung in vivo und in vitro - selektiv diese hydroxylierenden Reaktionen vom Typ der sog. mischfunktionellen Hydroxylase (MFH). Dabei handelt es sich um ein unspezifisches Hydroxylase-System, das im endoplasmatischen Retikulum, besonders der Leberzelle, lokalisiert ist (REMMER 1968). Akute Äthanolbelastung führt dabei zu einer dosisabhängigen, aber reversiblen Hemmung der Aktivität der MFH.

Die mischfunktionelle Hydroxylase (MFH) katalysiert die folgende Grundreaktion:

$$R\text{-}H + O_2 + H^+ + NADPH \xrightarrow[P\text{-}450\text{-}System]{Cytochrom-} R\text{-}OH + H^+ + NADP^+$$

(R-H: lipophiles Substrat, z.B. Arzneimittel)

Hierbei wird formal ein Wasserstoffatom (an C,N,S gebunden) durch eine Hydroxylgruppe ersetzt (Hydroxylierung). Das Sauerstoffatom entstammt dem O_2-Molekül, dessen andere Hälfte zu Wasser reduziert wird. Als Coferment ist NADPH, z.T. auch NADH, für den Ablauf der Reaktion essentiell.
Charakteristischer Bestandteil des komplexen Enzymsystems der MFH ist das Pigment Cytochrom-P-450, das im endoplasmatischen Retikulum der Leberzelle in hoher Konzentration vorkommt. Der Mechanismus der Hydroxylierungsreaktion verläuft in mehreren

Einzelschritten, wie dies in Abb.1 dargestellt ist.

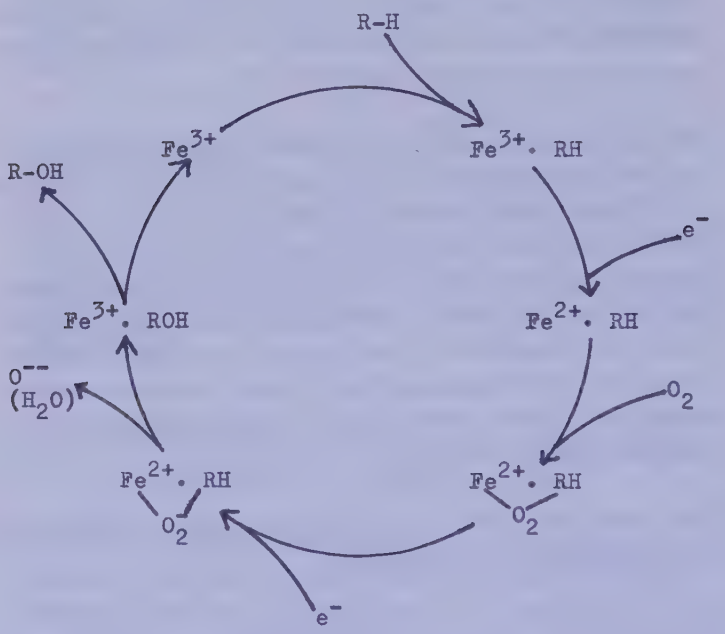


Abb.1 (nach GILLETTE et al. 1972 und nach MATSUBARA et al. 1976)

Nach Bindung eines Moleküls lipophilen Substrates (R-H) an das Cytochrom tritt eine Reduktion des Fe^{3+} ein (1-Elektron-Übergang durch spezifische Reduktase und NADPH). Der Cytochrom-(Fe^{2+})-Substrat-Komplex bindet nun ein Molekül O_2 als tertiären Komplex. Nach Aufnahme eines weiteren Elektrons (möglicherweise aus NADH) und einem (innerkomplexen) Valenzwechsel ($Fe^{2+} \rightarrow O_2$) zerfällt dieser Komplex unter Bildung von

1.) H_2O
2.) des nunmehr hydroxylierten Substrates (R-OH) und
3.) des Cytochrom-P-450-(Fe^{3+}), das einen neuen

Reaktionscyclus eingeht.
Das effektive hydroxylierende Agens bei der Gesamtreaktion ist z. Zt. noch unbekannt, es werden u.a. radikalische Mechanismen (OH•) diskutiert. Ebenso sind Einzelheiten des Elektronen-Transports bei der Hydroxylierung, sowie der innerkomplexe Valenzwechsel des Cytochrom-Eisens noch nicht geklärt. (MATSUBARA et al. 1976, HRYCAC and PROUGH 1974).

Als Angriffspunkt von Äthanol u.a. aliphatischen Alkoholen an der MFH ist nach derzeitiger Auffassung das Cytochrom-P-450 selbst anzusprechen (COHEN and MANNERING 1973, PETRUCH u. SCHÜPPEL 1971). Aliphatische Alkohole liefern mit isolierten Lebermikrosomen-Präparationen charakteristische sog. Bindungsspektren (REMMER et al. 1966, SCHENKMAN et al. 1967, PETRUCH u. SCHÜPPEL 1971, COHEN and MANNERING 1973, BIRKETT 1974), die als spektraloptisch faßbare Äquivalente für enge Substrat-Enzymprotein-Wechselwirkungen - hier mit dem Membran-gebundenen Cytochrom-P-450-Komplex - aufgefasst werden (REMMER et al. 1966, SCHENKMAN et al. 1967). Die Bindungsintensität der aliphatischen Alkohole an Lebermikrosomen nimmt mit der Kettenlänge bzw. mit der Lipophilität des Alkohols zu. (SCHÜPPEL 1969a, PETRUCH u. SCHÜPPEL 1971, COHEN and MANNERING 1973). Analog verhält sich die Hemmaktivität der Alkohole in vitro (gemessen als Inhibitorkonstante) und ebenfalls in vivo (SCHÜPPEL 1969a). Es besteht somit eine enge Korrelation zwischen der Bindung des Alkohols an Cytochrom-P-450-haltige Membranen des endoplasmatischen Retikulum und der Hemmwirkung des Alkohols auf den Umsatz der MFH.

Aus diesen Befunden wurde auf einen ausgeprägt lipophilen Anteil bzw. eine entsprechende Bindungsstelle

an der MFH geschlossen (COHEN and MANNERING 1973, SCHÜPPEL 1971a/b). Auf die Cytochrom-P-450-Reductase (NADPH) hat Äthanol nur geringfügig hemmenden Einfluß (MATSUBARA et al. 1976).

Zusammenfassend ergibt sich damit, daß Äthanol und bestimmte Arzneistoffe durch Wechselwirkung auf biochemischer Ebene sich gegenseitig in ihrem pharmakokinetischen Verhalten stören können. Diese Interferenz kommt als Ursache für manifeste Kombinationswirkungen durchaus in Betracht, wie im Tierversuch bisher für eine Reihe von Hypnotica bzw. Narkotica (WHITTLESEY 1954, MELVILLE et al. 1966, RUBIN and LIEBER 1968, GOLDWELL et al. 1970, RUBIN et al. 1970b, SCHÜPPEL u. PETRUCH 1971) und für einige blutzuckersenkenden Sulfonamid-Derivate (DATZ u. SCHÜPPEL 1970) eindeutig nachgewiesen worden ist.

Diese neueren biochemischen bzw. pharmakokinetischen Erkenntnisse haben das klassische pathogenetische Konzept der Kombinationswirkungen bedeutend erweitert und vertieft. Zugleich sind die Möglichkeiten zur Erkennung und zur Prophylaxe von Kombinationswirkungen verbessert und eine neuartige Basis für die experimentelle Untersuchung der Wechselwirkungen geschaffen worden.

1.6. Die Kombination von Barbituraten und Äthanol

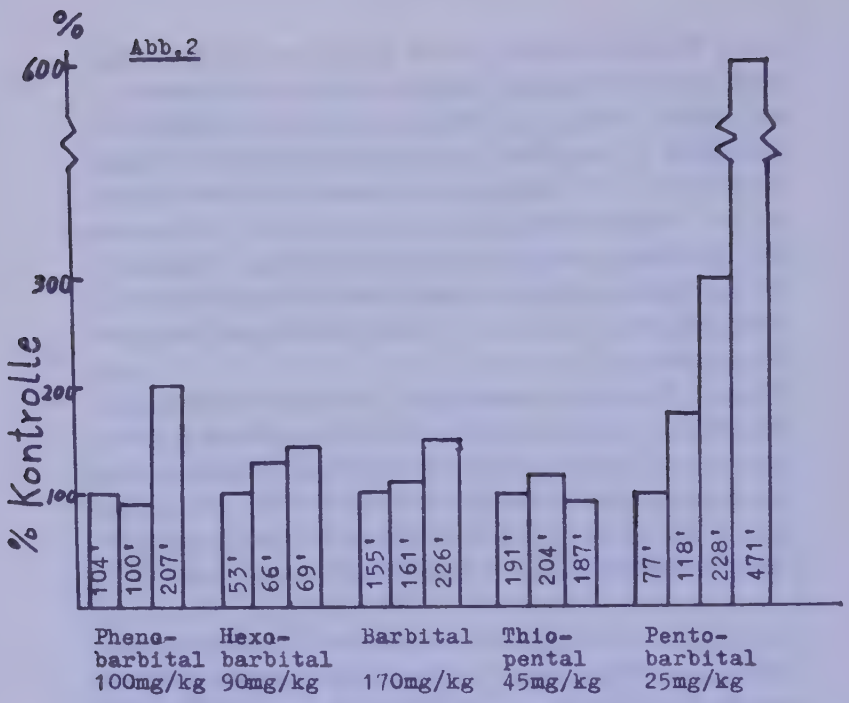
Unter den relevanten Kombinationen von Arzneistoffen und Alkohol sind diejenigen mit Barbitursäure-Derivaten als klassisches Modell der Interferenzpharmakologie anzusprechen. Seit der Erstbeschreibung durch CARRIERE et al. 1934 sowie OLSZYKA 1935 wurde

diese Wirkstoff-Kombination unter den verschiedensten Fragestellungen bearbeitet (s. dazu FORNEY and HUGHES 1968, POLACSEK et al. 1970, CALDWELL and SEVER 1974, MEZEY 1976, SEIXAS 1976). In Anbetracht der verschiedenen verwendeten Barbiturate und der experimentellen Randbedingungen entsprechend der jeweiligen speziellen Fragestellung nimmt es nicht Wunder, daß die Ergebnisse außerordentlich divergieren und sich in vielen Fällen geradezu widersprechen.
Aus der Fülle der Ergebnisse läßt sich aber u.a. entnehmen, daß im Tierversuch verschiedene Barbiturate mit gleichartiger Äthanolbelastung ein durchaus unterschiedliches Kombinationsverhalten aufweisen, z.B. bezüglich der erzielbaren Steigerung der Narkosewirkung durch zusätzliche Äthanolbelastung.

Dies wurde in systematischen Untersuchungen an Ratten mit verschiedenen Barbituraten inzwischen nachgewiesen (SCHÜPPEL u. PETRUCH 1971). Die Barbiturate wurden nach ihrem unterschiedlichen Abbau- bzw. Inaktivierungsmodus ausgewählt: Phenobarbital, Hexobarbital und Pentobarbital werden über mikrosomale Hydroxylierung, Thiopental durch oxidative Desulfurierung und Barbital rein renal eliminiert. Diese Differenzierung ermöglicht es, die selektiven Hemmeffekte von Äthanol auf den Arzneistoffwechsel auch im Tierexperiment zu überprüfen.

Wie die Abbildung und Tabelle (s. S.12,Abb.2 u. Tab.1) zeigen, weisen in der benutzten Versuchsanordnung (s. Legende) Barbital, Thiopental, Phenobarbital und Hexobarbital, jeweils in einer narkotischen Dosis i.p. verabfolgt, mit vorausgehender, nicht-narkotischer Äthanol-Dosis keine nennenswerte Verlängerung der Narkosedauer auf. Allein Pentobarbital zeigt hier eine deutliche, z.T. eindrucks-

Abb.2



Legende zur Abbildung (aus SCHÜPPEL 1971a): Verlängerung der Narkosedauer bei Ratten, die nach einer oralen, nicht narkotischen Äthanolbelastung (1,5;3,0;4,5ml/kg - letzteres nur für Pentobarbital) ein Barbiturat erhalten haben. Äthanol wurde 30 min vor der Gabe des jeweiligen Barbiturates (Dosis wie angegeben,i.p.) appliziert. Kontrollen (jeweils linke Säule eines Blockes = 100% Narkosedauer) erhalten statt Äthanol-Lösung ein gleiches Volumen Wasser. Die absolute Narkosedauer in min. ist in den Säulen angegeben.

Tabelle 1

Substrat	Dosis	Verlängerung der Narkosedauer, verglichen mit der Kontroll-Narkose ohne zusätzliche Äthanolbelastung
Pentobarbital	25 mg/kg	um 200%
Hexobarbital	90 mg/kg	um 30%
Phenobarbital	100 mg/kg	um 100%
Barbital	170 mg/kg	um 50%

volle Verlängerung der Narkosedauer in der Kombination mit Äthanol. Dieser Kombinationseffekt zeigt überdies eine deutliche Abhängigkeit von der verwendeten Äthanoldosis.
Die pharmakokinetische Analyse ermöglicht das Verständnis dieser auffallend selektiven Wechselwirkung. Für Barbital, Phenobarbital, Thiopental und Hexobarbital ergeben sich unter akuter Äthanolbelastung keine wesentlichen Störungen der Elimination, wie die einzelnen Blutspiegelkurven für diese Barbiturat-Derivate zeigen: übereinstimmend zeigen die Tiere keine Verlängerung der Narkosedauer (bei den gewählten Versuchsbedingungen). Diese Befunde zeigen ferner, daß eine direkte zentral-nervöse Wechselwirkung (pharmakodynamische W.W.) dieser Barbiturate mit Äthanol nur ganz gering zu veranschlagen ist: sie werden in dieser Versuchsanordnung durch den Parameter Narkose-Dauer nicht erfaßt.

Im Gegensatz dazu wird die Pentobarbital-Elimination durch Äthanol deutlich und Dosis-abhängig verzögert: der verzögerten Elimination entsprechen höhere Gewebespiegel von Pentobarbital, z.B. im Gehirn: verlängerte Narkose-Dauer ist die Folge. Nur im Falle des Pentobarbitals liegt somit eine pharmakokinetische Interferenz mit Äthanol vor, die einen manifesten Kombinationseffekt auslöst. Bei den übrigen untersuchten Barbituraten sind sie hier nicht nachweisbar.

Dies Ergebnis war im Falle des Barbitals und Thiopentals, bei Kenntnis der Eliminationswege, zu erwarten, bei Phenobarbital durch die relativ langsam ablaufende Hydroxylierung u.U. verständlich; nur im Falle des Hexobarbital bildet sie ein überraschendes Ergebnis: denn Hexobarbital gilt geradezu als Standard-Substrat der MFH und eine wirksame Hemmung

des Abbaus durch Äthanol war hier zu erwarten. Daraus ergibt sich, daß Äthanol die mikrosomale Hexobarbital-Hydroxylierung nicht wesentlich zu hemmen vermag, während die Pentobarbital-Hydroxylierung durch Äthanol (in gleicher Dosis) sehr wirksam gehemmt wird. Zwischen der mikrosomalen Hydroxylierung dieser beiden strukturell so ähnlichen Substrate besteht in vivo somit ein wichtiger Unterschied in der Hemmbarkeit durch Äthanol. Gleichzeitig erweist sich Äthanol damit als ein hochselektiver Inhibitor mikrosomaler Hydroxylierungsreaktionen, was bisher nicht bekannt war. Weiterhin ist das unterschiedliche Ansprechen der sehr ähnlichen Stoffwechselreaktionen im E.R. der Leberzelle für das Kombinationsverhalten der beiden Arzneistoffe mit akuter Äthanolbelastung offenbar entscheidender als eine allfällige zentralnervöse Interferenz mit Äthanol.

1.7. Fragestellung der vorliegenden Arbeit und allgemeines methodisches Vorgehen

Wie im pharmakologischen Experiment und bei der pharmakokinetischen Analyse in vivo gezeigt wurde, besteht zwischen Hexobarbital und Pentobarbital ein wesentlicher Unterschied im Kombinationsverhalten mit Äthanol: die metabolische Elimination von Pentobarbital wird durch Äthanol Dosis-abhängig verzögert, diejenige von Hexobarbital durch gleiche Äthanolmengen bzw. -konzentrationen jedoch nicht beeinflußt. Dieser Unterschied muß auf der Stoffwechselebene lokalisiert sein, und zwar in unterschiedlicher Hemmbarkeit der mikrosomalen Hydroxylierungsreaktionen für beide Substrate durch Äthanol. Diese Differenzierung sollte mit Hilfe der enzymatischen Analyse in vitro näher charakterisiert werden.

Die beiden Barbitursäure-Derivate, Hexobarbital und

Tabelle der enzymkinetischen Werte der Literatur

(s. dazu Text S.15)

	I	II	III
Hexobarbital:			
K_m (mM)	0,1	0,16	0,19 ± 0,05
V_{max} ($nMol \cdot mgProt^{-1} \cdot min^{-1}$)	-	-	5,9
Substratbereich (mM)	-	-	0,25 - 1,6
Pentobarbital:			
K_m (mM)	-	0,30	0,25 ± 0,04
V_{max} ($nMol \cdot mgProt^{-1} \cdot min^{-1}$)	-	-	1,5
Substratbereich (mM)	-	-	0,5 - 1,6

I: Schenkman,J.B. et al.(1967)
II: Martin,Y.C. et al.(1971)
III: Sitar,D.S. et al. (1973)

Pentobarbital, eignen sich für die Untersuchung mit isolierten Leber-Mikrosomen in vitro unterschiedlich gut. Hexobarbital stellt ein sehr gutes Substrat für die MFH in vitro dar. Für enzymkinetische Versuche wird der Umsatz über den verbleibenden Rest Hexobarbital (nach der Zeit t) im Ansatz bestimmt. Die Umsätze innerhalb von 10-20 min. sind groß genug, um mit einer UV-spektrometischen Analysenmethode erfaßt zu werden (BRODIE et al. 1953).
Pentobarbital dagegen wird nur langsam von isolierten Mikrosomen umgesetzt; es ist daher als Substrat für kinetische Messungen nach der üblichen Restmethode (UV) nur schlecht geeignet. Die bisher vorliegenden Messungen zum Pentobarbital-Abbau in vitro sind z.T. indirekt gewonnen, z.B. über den NADPH-Verbrauch (SCHENKMAN et al. 1972) und daher wenig zuverlässig. Neuere Untersuchungen beruhen auf der Bestimmung der gebildeten Oxidationsprodukte (nach chromatographischer Trennung) (SITAR and MANNERING 1973).
Das Problem kann direkt nur durch den Einsatz sehr empfindlicher und selektiver Analysenmethoden gelöst werden, so z.B. durch den Einsatz radioaktiv markierten Pentobarbitals (KUNTZMANN et al. 1967). Für uns ergab sich die Möglichkeit, eine neu entwickelte Methode der quantitativen Dünnschicht-Chromatographie für diese Bestimmung einzusetzen (DC-Scanning mit UV-Reflexion) (BREYER u. VILLUMSEN 1975). Diese Methode erlaubt Messungen im Konzentrationsbereich 10-100 nMol Pentobarbital.

Es wurden für die Untersuchungen Lebermikrosomen von unbehandelten Ratten verwendet (männlich, Stamm Ivanovas, Wistar-Spez., Kißlegg, 200-250g), die mit Altromin-Trockenfutter ernährt wurden, Futterentzug 8 Stunden vor Tötung, Wasser ad libitum.

1.7.1. Mikrosomale Hexobarbital-Hydroxylierung in vitro

1.7.1.1. Bestimmung von Hexobarbital im biologischen Material (Mikrosomen-Suspension) mit der Methode nach BRODIE et al. 1953 (s. 2.2.1.1.)

1.7.1.2. Kontrolle der der Linearität des Abbaues über die Zeit (5-10 min) (s. 2.2.5.1.)

1.7.1.3. Bestimmung von K_m und V_{max} im Substratbereich von 0,1-1,0 mM (=100-1000 nMol/ml) (s. 2.2.1.3.1.)

1.7.1.4. Hemmversuche im gleichen Bereich mit Äthanol-Inhibitor-Konzentrations-Bereich 32-141 mM (=1,4-6,4‰) (s. 2.2.1.4.2.ff.)

Alkoholgehalt im Ansatz nach BÜCHER 1951 bestimmt. (s. 2.3.)

1.7.1.5. Bestimmung von Hexobarbital im biologischen Material nach BREYER et al. 1975 (Isolierung und quantitatives DC-Scanning) in niedrigem Substratbereich:
K_m und V_{max} -Bestimmung für Hexobarbital im Substratbereich 0,1-0,5 mM (s. 2.2.3.1.)

1.7.1.6. Hemmversuch mit Äthanol in diesem Substratbereich (s. 2.2.3.2.)

1.7.2. Mikrosomale Pentobarbital-Hydroxylierung in vitro

1.7.2.1. Verschiedene Vorversuche mit der Bestimmungsmethode von BRODIE et al. 1953 ergaben

bei Einsatz von Pentobarbital als Substrat der mikrosomalen Ansätze nicht verwertbare Ergebnisse.

1.7.2.2. Analytik auf quantitatives DC-Scanning nach BREYER et al. 1975 umgestellt und Bestimmung von K_m u. V_{max} für Pentobarbital im Substratbereich 0,01-0,1 mM (=10-100 nMol/ml) (s. 2.2.2.4.1./2.)

1.7.2.3. Kontrolle der Linearität des Abbaues über die Zeit (20 min) (s. 2.2.5.2.)

1.7.2.4. Hemmung im Substratbereich 0,01-0,1 mM mit Äthanol als Inhibitor (Bereich 57-108 mM bzw. 2,6-5,0‰) (s. 2.2.2.4.3.ff.)

Kontrolle des Äthanolgehaltes im Ansatz nach BÜCHER 1951 (s. 2.3.)

1.7.3. Vergleichender Hemmversuch unter identischen Bedingungen

Vergleichender Hemmversuch zwischen Hexobarbital- und Pentobarbital-Hydroxylierung bei identischer Substratkonzentration (0,1 mM) und vergleichbarer Äthanolkonzentration (71 mM vs. 60 mM Äthanol im Ansatz). Aufarbeitung und Bestimmung der Substrate mit der Methode nach BREYER et al. 1975. (s. 2.2.4.)

1.8. Ergebnisse

In Tab.2 (s. 1.8.4.) sind die ermittelten enzymkinetischen Parameter zusammengefaßt.

1.8.1. Versuche mit Hexobarbital

Die Ergebnisse der Hemmversuche mit Äthanol als Inhibitor zeigen die Abbildungen 3-5 im 1/s-1/V-(Lineweaver-Burk)-Diagramm. Die eingezeichnete Gerade bezieht sich dabei auf die ungehemmte Enzymreaktion. Es zeigt sich, daß die Daten der gehemmten Versuche sich unabhängig von der benützten Hemmkonzentration (32-141 mM bzw. 1,5-6,4%o) gleichmäßig um die eingezeichnete Gerade gruppieren. Eine Hemmung ist praktische nicht festzustellen. Nur bei hoher Hemmkonzentration von 120 mM bzw. 5,5%o (Abb.4) und 141 mM bzw. 6,4%o (Abb.5) sind für einzelne Meßpunkte gehemmte Abbauraten festzustellen.

Abb.10 zeigt, daß selbst bei niedriger Substratkonzentration (0,1÷0,2 mM bzw. 100-200 nMol/ml) und hoher Inhibitorkonzentration (135 mM bzw. 6,2%o Äthanol) die Kinetik nicht eindeutig gehemmt ist; möglicherweise ist eine Hemmungskinetik vom un-kompetitiven Typ (DAWES 1972) angedeutet, die mit den erzielten Versuchsdaten aber nicht genügend aufgelöst wird.

K_i-Werte sind nicht exakt zu ermitteln. Aus Versuch Nr. 2.2.3.2. (Abb.10) ergibt sich rechnerisch (DAWES 1972) ein K_i-Wert von 945 mM.

1.8.2. Versuche mit Pentobarbital

Abb. 6 u. 7 zeigen, wie die Umsatzrate von Pentobarbital schon bei einer Äthanolkonzentration von 57 mM bzw. 2,6%o gehemmt wird. Es handelt sich dabei offenbar um eine Hemmung vom un-kompetitiven Typ (DAWES 1972).

Noch deutlicher wird die Hemmung bei einer Äthanolkonzentration von 108 mM bzw. 5,0‰ (Abb. 8.u.9).

Aus den Experimenten Nr. 2.2.2.4.3./4./5./6. ergibt sich rechnerisch (DAWES 1972) ein K_i-Wert im Bereich von 122 ± 11,5 mM ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

1.8.3. Vergleichender Hemmversuch unter identischen Bedingungen

Die unterschiedliche Hemmbarkeit der beiden Barbiturate wird nochmals deutlich in Abb.11 im 1/v vs. (I)-Dixon-Diagramm. Die Substratkonzentration lag je bei 0,1 mM bzw. 100 nMol/ml, die Hemmkonzentration des Inhibitors Äthanol bei 60 mM bzw. 2,8‰ bei Pentobarbital, bei 71 mM bzw. 3,3‰ bei Hexobarbital. Während der K_i-Wert für Hexobarbital in diesem Versuch (s. 2.2.4.) bei ∞ lag, ergab sich ein K_i-Wert von 220 mM für die Pentobarbital-Hydroxylierung.

1.8.4. Tabelle der ermittelten enzymkinetischen Parameter

(s. Tab.2 Seite 20)

1.8.4. Tabelle der ermittelten enzymkinetischen Parameter

Substrat	n	K_m	V_{max}	Substrat-konzent.-Bereich	Athanol-konzent.-Bereich	K_i	Methodik
		mM	nMol/mg Prot. x min	mM	mM/%o	mM	
Hexobarbital	4	0,19±0,03	12,0±0,9	0,14-1,0	-	-	UV-Messung nach BRODIE 1953
	3			0,14-1,0	32/1,5 bis 141/6,4	unbestimmbar	
	1	0,14	16,3	0,1-0,5	-	-	DC-Scanning nach BREYER et al 1975
	1			0,1-0,2	135/6,2	(945)	
	1			0,1	71/3,3	∞	
Pentobarbital	5	0,16±0,02	2,38±0,18	0,01-0,1	-	-	
	2			0,01-0,1	57/2,6	107 bzw 101	
	2			0,01-0,1	108/5,0	128 bzw 152	
	1			0,1	60/2,8	(220)	

1.9. Besprechung der Ergebnisse

Die vorliegenden Ergebnisse enzymkinetischer Versuche mit der mikrosomalen Hydroxylierung von Hexobarbital bzw. von Pentobarbital zeigen, daß beide Reaktionen sich gegenüber Äthanol sehr unterschiedlich verhalten. Die Versuche in vitro bestätigen damit die in vivo beobachteten Unterschiede im Kombinationsverhalten der beiden Barbiturate mit akuter Äthanolbelastung.

Äthanol stört demnach selektiv die mikrosomale Hydroxylierung von Pentobarbital in der Leber und führt zu einem verzögerten Abbau des Hypnotikums. Die Verlängerung der Halbwertzeit ist als die entscheidende Ursache für die ausgeprägte Verlängerung der Narkosedauer nach Pentobarbital anzusehen.
Der mikrosomale Hexobarbitalabbau wird durch vergleichbare Äthanol-Dosen vergleichsweise nicht beeinflußt: dementsprechend fehlen in vivo Störungen der Hexobarbital-Pharmakokinetik bzw. manifeste Kombinationseffekte im Sinne einer Narkose-Verlängerung.

Diese Ergebnisse entsprechen voll den Resultaten von LESLIE et al. (1971), die bei Ratten unter akuter Äthanol-Gabe (2,0 g/kg als 13% i.p.) in Hirn, Leber und auch im Blut (nach 10,30,60 min p.appl. von ^{14}C-Pentobarbital i.p.) höhere Pentobarbital-Konzentrationen fanden als bei den Kontrollen. Sie haben bereits eine Störung der peripheren Pentobarbital-Elimination durch Äthanol als Ursache dieser pharmakokinetischen Störung vermutet. RUBIN and LIEBER (1968) zeigten mit ^{14}C-Pentobarbital bei Ratten unter akuter Äthanolbelastung (5ml/kg) eine Verdopplung der Halbwertzeit, desgleichen beim Menschen die gleichen Autoren (RUBIN et al. 1970).

Analoge Ergebnisse fand SEIDEL (1967) bei alkoholbelasteten Mäusen; hier vergrößerten sich die Differenzen bei den Pentobarbital-Konzentrationen Äthanoltiere vs. Kontrolltiere mit der Zeitdauer nach Applikation, was typisch für eine metabolische Störung der hier vorliegenden Art ist.

Im Gegensatz dazu haben COLDWELL et al. 1970 in ähnlicher Versuchsanordnung bei Ratten unter Äthanolbelastung (3,0 g/kg i.p. als 15%-Lösung in Saline) zur Aufwachzeit (=225 min.) gegenüber Kontrolltieren eine niedrigere Pentobarbital-Konzentration (Dosis: 30 mg Pentobarbital i.p.) im Hirn gefunden. Auch GRAHAM (1960) konnte bei Ratten, die neben Pentobarbital (80 mg/kg oral) gleichzeitig und zusätzlich Äthanol (2,0 ml/kg als 20% bzw. 40%-Lösung) oder Wasser erhalten hatten, 30 min nach Applikation keine Unterschiede in den Pentobarbital-Konzentrationen im Gehirn feststellen, im Blut wurde eher eine leichte Abnahme der Pentobarbital-Konzentration unter Äthanol gefunden.

Entsprechende Ergebnisse zur Wirkungsinterferenz und Pharmakokinetik von Hexobarbital und Äthanol in vivo bzw. von biochemisch faßbaren Wechselwirkungen in vitro sind spärlich und widersprüchlich. MALLOW and BAESL (1972) fanden nach akuter oraler Äthanolgabe bei Ratten (4,71 g/kg als 50 Vol%-Lösung) nach weiteren 17 hrs - also nach Abbau des zugeführten Alkohols - die Hexobarbital-Elimination innerhalb von 30-90 min. nach Hexobarbital-Applikation (100 mg/kg i.p.) erheblich beschleunigt (K_e von 0,0249 auf 0,0371). Die mikrosomale Hexobarbital-Hydroxylierung in vitro war unter gleichen Bedingungen (Tiere 17 hrs nach Äthanolgabe getötet und Lebermikrosomen gewonnen) entsprechend erheblich beschleunigt.

Dagegen fanden HO CHANG and BROWN (1976) nach akuter Vorbehandlung von Ratten mit Äthanol (1,0-6,0 g/kg als 15 Vol%-Lösung, oral) eine (dosisabhängige) Hemmung des Hexobarbital-Abbaues im Leberhomogenat. Zugleich fanden sie in den Mikrosomen nach Äthanolbelastung eine Verminderung des Cytochrom-P-450-Gehaltes um 42%. Gleichwohl führen sie die beobachteten Hemmwirkungen nach Äthanolgabe auf eine Corticosteron-Freisetzung zurück, die durch Äthanolbelastung ausgelöst würde. Kinetische Daten zur Hemmung der mikrosomalen Hexobarbital-Hydroxylierung werden nicht angegeben.

Dieser Überblick ergibt keine einheitliche Auffassung, weder über die biochemische Wechselwirkung von Barbiturat-Hydroxylierung mit Äthanolbelastung in vitro noch über pharmakokinetische oder pharmakodynamische Interferenzen in vivo.

Die Ergebnisse der vorliegenden enzymkinetischen Untersuchungen belegen jedoch für die zwei Barbitursäure-Derivate eindeutige Unterschiede im Verhalten gegenüber Äthanol als Inhibitor der mischfunktionellen Hydroxylase. Wie die Tabelle zeigt (s. Tab.2 S.20), werden mit zwei unabhängigen Verfahren für die Hexobarbital-Hydroxylierung praktisch identische Kennwerte (K_m bzw. V_{max}) erhalten. Eine Inhibitorkonstante K_i konnte für diese Reaktion bei den verwendeten Alkohol-Konzentrationen, die sich am biologisch interessierenden Bereich orientieren, nicht ermittelt werden; im Versuch Nr. 2.2.3.2. wurde versuchsweise eine orientierender Wert im Bereich von 950 mM errechnet. Die Kenndaten für die Pentobarbital-Hydroxylierung ergeben einen identischen K_m-Wert bei einem gegenüber Hexobarbital erheblich kleineren V_{max}-Wert; eine Inhibitor-Konstante K_i kann aus 4 Bestimmungen zu etwa 122±11 mM ($\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$) angegeben werden.

Die enzymkinetischen Daten liefern somit keine Erklärung für die selektive Hemmbarkeit der Pentobarbital-Hydroxylierung durch Äthanol: die K_m-Werte - und damit die Affinität dieser Substrate für die MFH - sind praktisch identisch (s.Tab.2 S.20). Auch die spektrale Bindungskonstante K_s für die Bindung von Hexobarbital bzw. Pentobarbital (Typ-I-Spektrum) an das mikrosomale Cytochrom-P-450 sind identisch (s.Tab.3)

Autor	Substrat	K_s (mM)
TOPHAM 1970	Hexobarbital	0,09
	Pentobarbital	0,075
SCHENKMAN	Hexobarbital	0,08
et al. 1972	Pentobarbital	0,06

Tab. 3

Auch in der Lipidlöslichkeit und im pK_a der beiden Barbiturate bestehen keine wesentliche Unterschiede. (SCHENKMAN et al. 1972)
Damit entfallen mögliche Unterschiede in der Enzymaffinität, im Bindungsverhalten und der Lipophilität der untersuchten Substanzen als Erklärung für die auffallende Differenzierung gegenüber Äthanol. So müßte eine denkbare (kompetitive) Verdrängung der Substrate durch Äthanol, der selbst ein Typ-II-Spektrum mit Cytochrom-P-450 bildet, den Umsatz beider Substrate in etwa gleichem Ausmaß betreffen - dies trifft aber nicht zu.

Aus den Ergebnissen der Tabelle 2 (s.S.20) ist der erhebliche Unterschied in der Umsatzgeschwindigkeit für

beide Substrate hervorzuheben: der V_{max}-Wert beträgt für Hexobarbital etwa das 5-fache dessen für Pentobarbital. Inwieweit unmittelbar greifbare chemische Strukturmerkmale (in einer analogen Reihe) die Umsatzgeschwindigkeit der MFH (mit-)bestimmen, ist z.Zt. nicht bekannt. Spektrale Dissoziationskonstanen K_s ergeben nur in einem engen Bezugrahmen gewisse Hinweise, wie TOPHAM (1970) in der Reihe der Barbiturate gefunden hat.

1.10. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit umfaßt enzymkinetische Untersuchungen über die mikrosomale Hydroxylierung von Hexobarbital und Pentobarbital unter dem Einfluß von Äthanol. Neben Bestimmung von K_m u. V_{max} für beide Reaktionen wird der Hemmeffekt von Äthanol darauf näher untersucht.

Für beide Barbitursäure-Derivate ist der K_m-Wert praktisch identisch und liegt im Bereich von 0,14-0,19 mM. Die Umsatzgeschwindigkeit, bestimmt als V_{max}, liegt dagegen für Hexobarbital etwa fünfmal höher als für Pentobarbital.

Die Hexobarbital-Hydroxylierung wird durch Äthanol, im Bereich bis 140 mM, nicht gehemmt, ein K_i-Wert konnte nicht exakt ermittelt werden; aus einem Versuch wurde er zu etwa 945 mM überschlägig errechnet. Demgegenüber übt Äthanol im gleichen Konzentrationsbereich eine deutliche Hemmwirkung auf die Pentobarbital-Hydroxylierung aus. Graphisch ist der Hemmungstypus offenbar un-kompetitiv. Ein K_i-Wert wurde zu 122±11 mM bestimmt.

Die Ergebnisse der biochemischen Untersuchung bestätigen pharmakologische und pharmakokinetische Befunde in vivo, die eine selektive Interferenz zwischen Pentobarbital und Athanol auf der Ebene des Arzneistoffwechsels wahrscheinlich gemacht hatten.

Ursachen für diese auffällige Differenzierung im Rahmen der mischfunktionellen Hydroxylierung der Barbiturate werden diskutiert.

Versuch Nr. 2.2.1.4.2. (Abb. 3)
1/s-1/v-(Lineweaver-Burk)-Diagramm der Hexobarbital-Hydroxylierung in vitro.
Hemmung durch Äthanol: 10 u. 20 µl
mittlerer Äthanolgehalt (n=5): 10 µl = 1,5‰ bzw. 32 mM
20 µl = 2,0‰ bzw. 45 mM

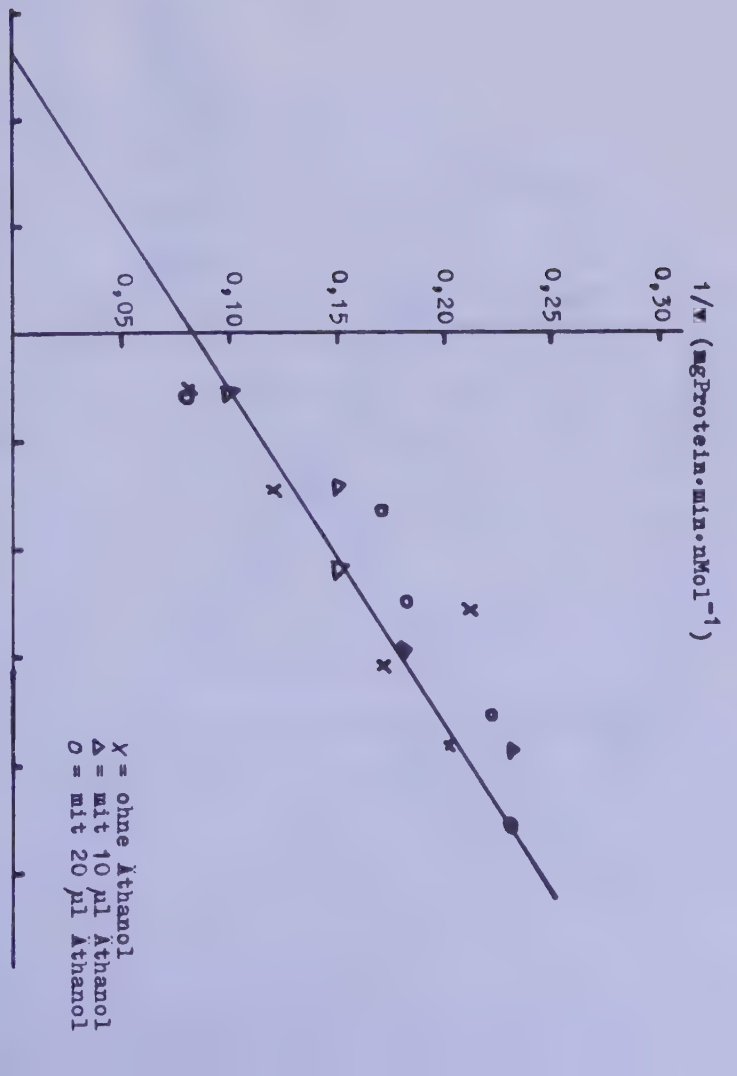


Abb. 3

Versuch Nr. 2.2.1.4.3. (Abb. 4)

1/s-1/v-(Lineweaver-Burk)-Diagramm der Hexobarbital-Hydroxylierung in vitro.

Hemmung durch Äthanol: 10, 20 u. 50 µl

mittlerer Äthanolgehalt (n=5): 10 µl ≙ 1,4‰ bzw. 32 mM
20 µl ≙ 2,9‰ bzw. 63 mM
50 µl ≙ 5,5‰ bzw. 120 mM

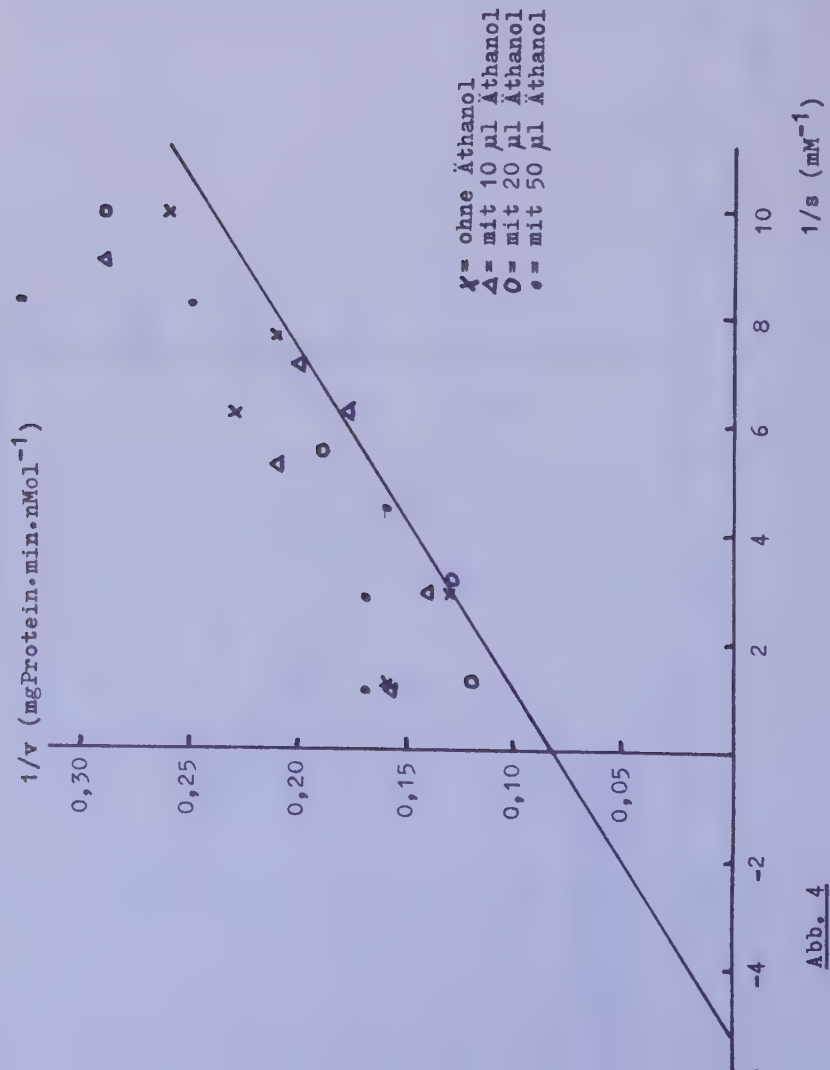


Abb. 4

Versuch Nr. 2.2.1.4.4. (Abb. 5)

1/s-1/v-(Lineweaver-Burk)-Diagramm der Hexobarbital-Hydroxylierung in vitro.

Hemmung durch Athanol: 10, 20 u. 50 µl

mittlerer Athanolgehalt (n=5): 10 µl ≙ 1,5‰ bzw. 34 mM
20 µl ≙ 3,3‰ bzw. 73 mM
50 µl ≙ 6,4‰ bzw. 141 mM

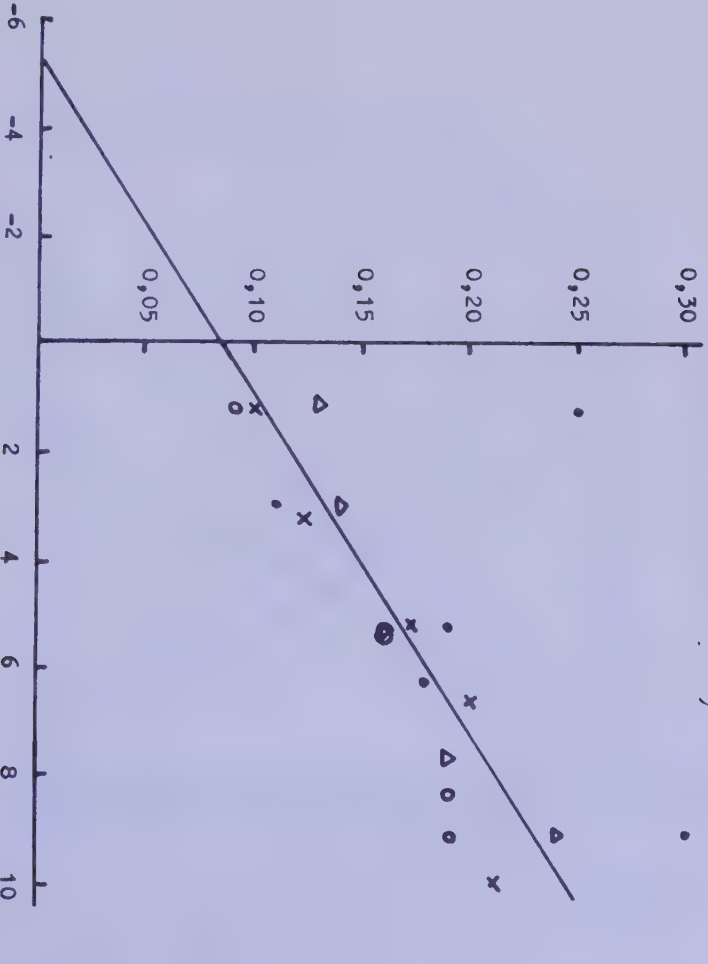


Abb. 5

Versuch Nr. 2.2.2.4.3. (Abb. 6)
1/s-1/v-(Lineweaver-Burk)-Diagramm der Pentobarbital-Hydroxylierung in vitro.
Hemmung durch Äthanol: 20 µl
mittlerer Äthanolgehalt (n=5): 2,6‰ bzw. 57 mM

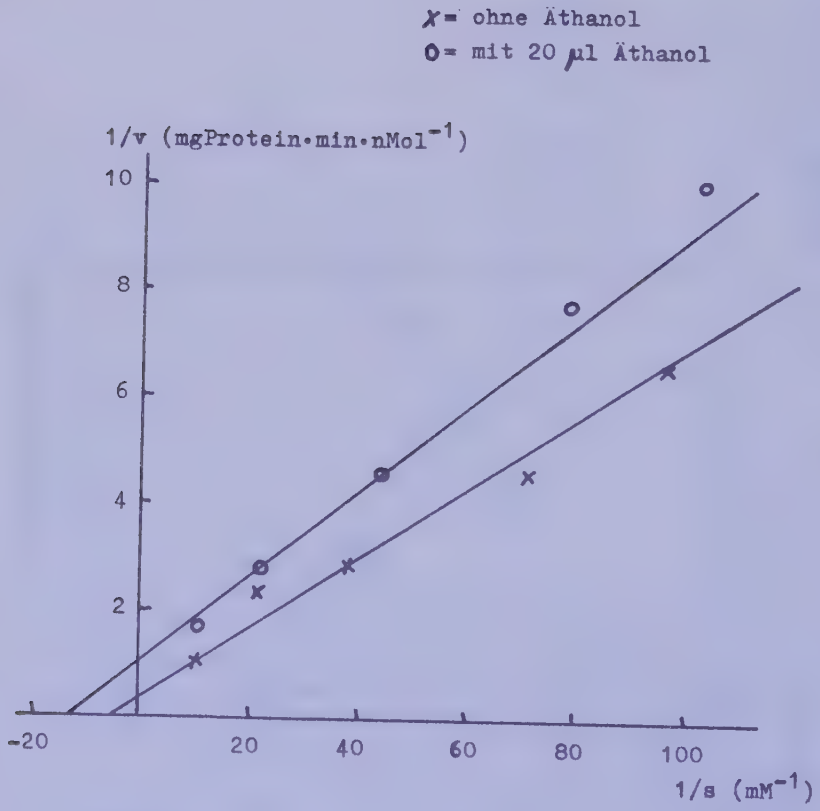


Abb. 6

Versuch Nr. 2.2.2.4.4. (Abb.7)
1/s-1/v-(Lineweaver-Burk)-Diagramm der Pentobarbital-Hydroxylierung in vitro.
Hemmung durch Äthanol: 20 µl
mittlerer Äthanolgehalt (n=4): 2,6‰ bzw. 57 mM

x = ohne Äthanol
o = mit 20 µl Äthanol

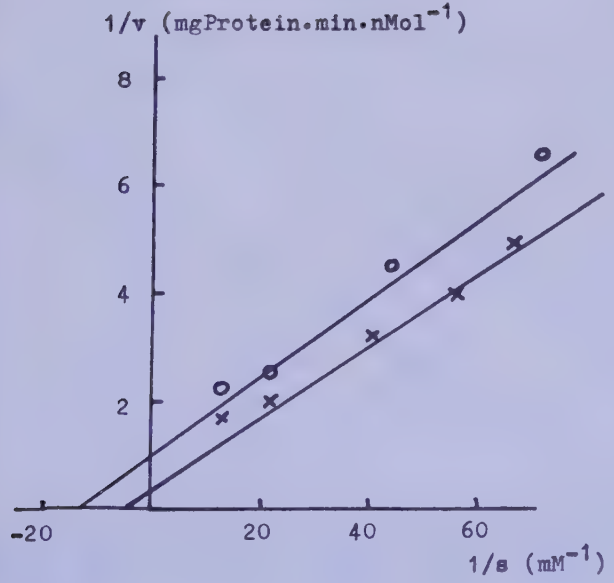


Abb. 7

Versuch Nr. 2.2.2.4.5. (Abb. 8)
1/s-1/v-(Lineweaver-Burk)-Diagramm der Pentobarbital-Hydroxylierung in vitro.
Hemmung durch Äthanol: 50 µl
mittlerer Äthanolgehalt (n=4): 5,0‰ bzw. 108 mM

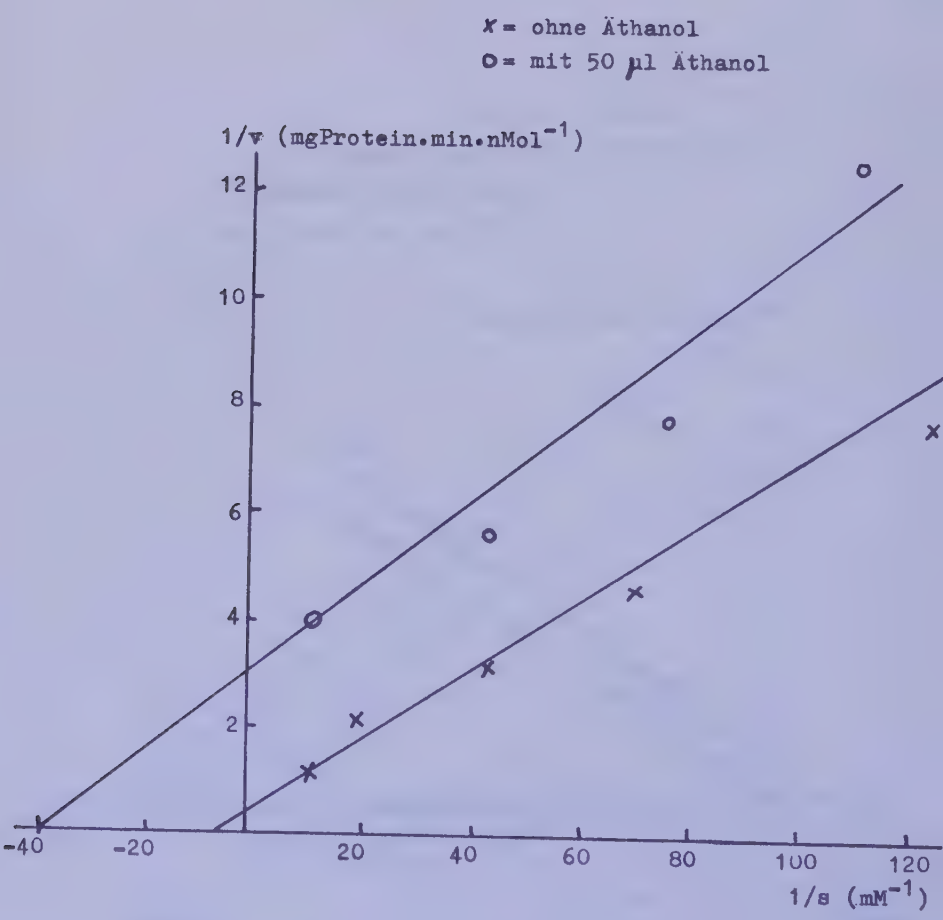


Abb. 8

Versuch Nr. 2.2.2.4.6. (Abb. 9)
1/s-1/v-(Lineweaver-Burk)-Diagramm der Pentobarbital-Hydroxylierung in vitro.
Hemmung durch Äthanol: 50 µl
mittlerer Äthanolgehalt (n=5): 5,0‰ bzw. 108 mM

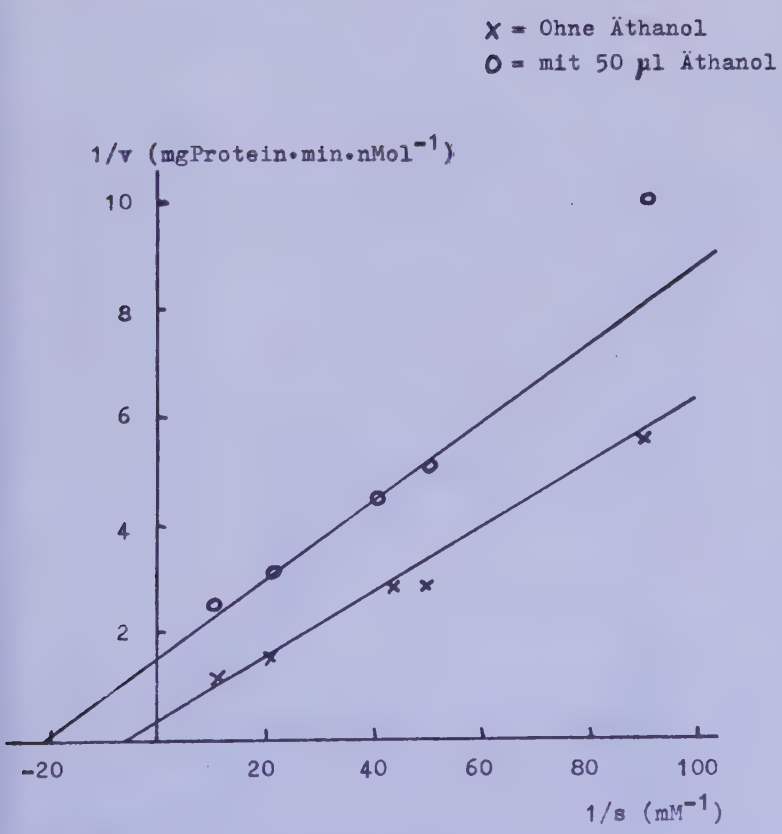


Abb. 9

Versuch Nr. 2.2.3.2. (Abb. 10)
1/s-1/v-(Lineweaver-Burk)-Diagramm der Hexobarbital-Hydroxylierung in vitro.
Hemmung durch Äthanol: 50 µl
mittlerer Äthanolgehalt (n=3): 6,2‰ bzw. 135 mM

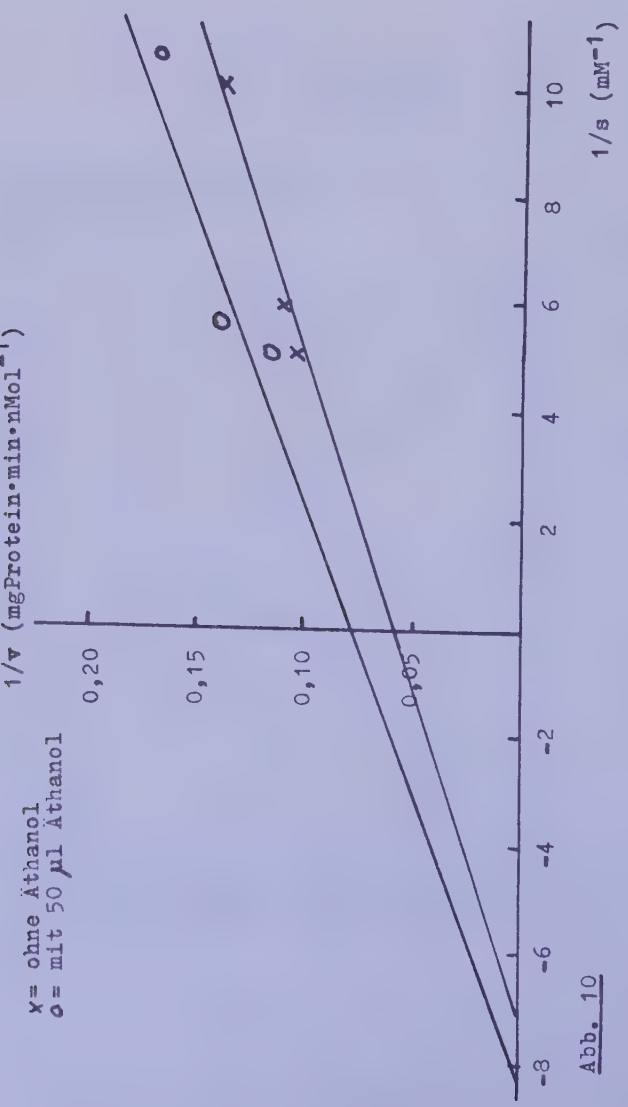


Abb. 10

Versuch Nr. 2.2.4. (Abb. 11)
1/v vs. (I)-Dixon-Diagramm,
Vergleich: Pentobarbital - Hexobarbital
(Hemmung durch Äthanol)
mittlerer Äthanolgehalt (n=3):
60 mM bzw. 2,8%o (Pentob.)
71 mM bzw. 3,3%o (Hexob.)

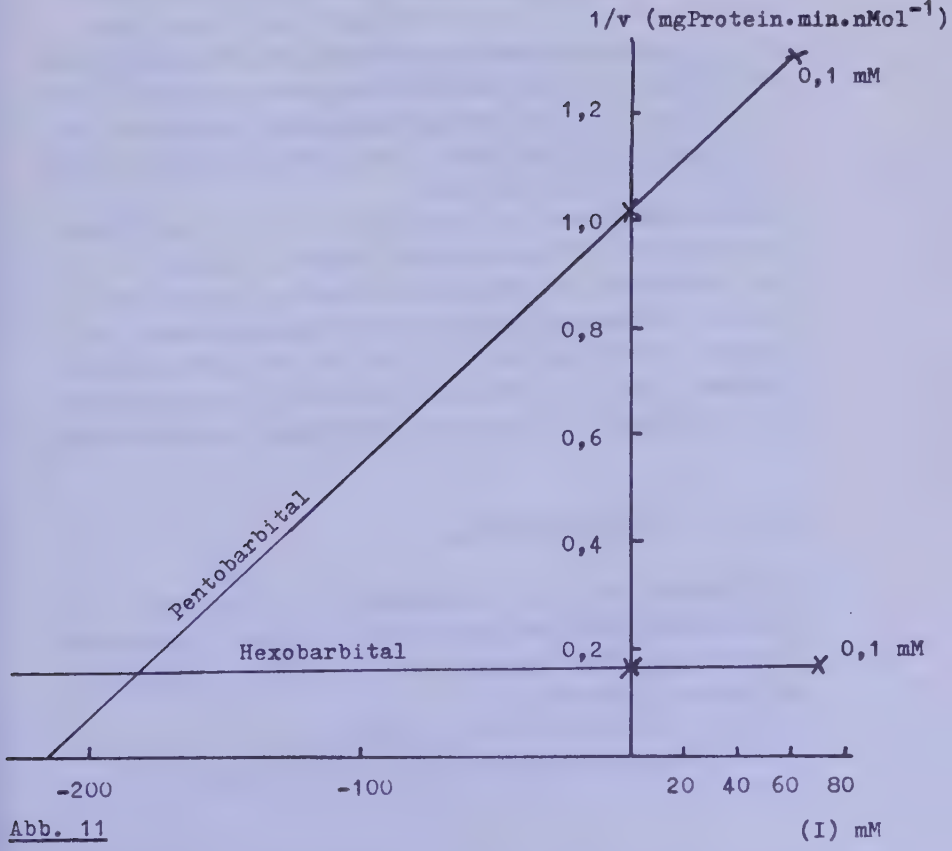


Abb. 11

2. Experimenteller Teil

2.1. Gewinnung von Rattenlebermikrosomen

2.1.1. Mikrosomenpräparation

Fünf männliche Ratten (Stamm Ivanovas, Wistar-Spez., Kißlegg, 200-250g) werden durch Nackenschlag getötet und ausgeblutet. Die Lebern werden rasch entnommen und in kalter (4°C) NaCl-Lösung (0,9%) gesäubert, und anschließend mit der Schere zerkleinert. Ungefähr 5,3g des zerkleinerten Organs werden mit 28 ml SVT-Lösung (Saccharose 8,59g, EDTA 0,2g, Tris-Substanz 0,242g, auf 100 ml Lösung und mit n-HCl auf pH 7,4 bringen), homogenisiert und anschließend in der Kühlzentrifuge folgendermaßen zentrifugiert:
-- 7 Min. bei 500 U/min, dann sofort erhöhen
-- 3 Min. bei 3 000 U/min, den Überstand davon
--10 Min. bei 10ooo U/min.
Anschließend wird der Überstand 1 h bei 40 000 U/min in der Spinco-Ultrazentrifuge abgeschleudert.
Nach Verwerfen des Uberstandes werden die sedimentierten Mikrosomen in SVT-Lösung aufgeschwemmt, und die Suspension nochmals 1 h bei 40 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird wiederum abgegossen und die Mikrosomen in etwa 25 ml SVT-Lösung aufgeschwemmt.

2.1.2. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Mikrosomen wird nach einer modifizierten LOWRY-Methode (1951) bestimmt. Aus einer Verdünnung 1:100 (Wasser) werden jeweils Doppelbestimmungen angesetzt:
0,5 ml Protein-Verdünnung (1:100)
(bzw. für die Referenz 0,5 ml Wasser),

0,5 ml n-NaOH,
5,0 ml alk. Cu-Reagenz
(aus 5o ml 2% Na_2CO_3 + 0,5 ml 2,7% K-Na-Tartratlösung + 0,5 ml 1% Kupfersulfat-Lösung ($CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$)).

Mischen und 10 min. stehen lassen.
Dann 0,5 ml Folin-Ciocalteu's Reagenz (Merck, Nr. 9001), 1:1 verdünnt mit Wasser, zugeben, kräftig schütteln und nach 30 min. bei 720 nm messen.
(Referenz: RLW + H_2O).

Standardkurve aus Rinderserumalbumin:
100 EE_{720} = 68 µg/ml der Verdünnung (1:100).

Der Proteingehalt der Mikrosomensuspension liegt bei etwa 13-16 mg Protein/ml. Er wird für die Inkubation auf 5,0 mg Protein/ml mit SVT-Lösung verdünnt. (Für die Pentobarbital-Kinetik auf 10 mg Protein/ml.)

2.2. Umsetzungen von Barbituraten in vitro

2.2.1. Inkubation von Hexobarbital

Hexobarbital ist ein Substrat der mikrosomalen Hydroxylierung. Mit der unten beschriebenen Methode nach BRODIE et al. (1953) kann die Kinetik des mikrosomalen Hexobarbitalabbaus unter Einfluß von Äthanol in vitro direkt gemessen werden.

2.2.1.1. Bestimmung von Hexobarbital nach BRODIE et al. (1953)

2.2.1.1.1. Prinzip der Methode

Hexobarbital wird bei neutralem pH (7,0) mit Petroläther aus wässrigem Milieu extrahiert. Durch Reextraktion mit wässrigem Alkali aus dem abgetrennten Petroläther kann das Hexobarbital nun isoliert und bei 242 und 260 nm dessen Extinktion gemessen werden.

2.2.1.1.2. Ausführung

1,0 ml des mikrosomalen Inkubationsansatzes, der Hexobarbital enthält, 1,0 ml Phasphatpuffer pH 7,0 und 0,5 g NaCl werden in einer etwa 80 ml fassenden Schüttelbirne mit Schliffstopfen mit 30 ml Petroläther 45 min. auf der Schüttelmaschine geschüttelt. Anschließend wird 10 min. bei 2000 U/min zentrifugiert. 25 ml der überstehenden Petroläther-Phase werden abgehoben, in eine zweite Schüttelbirne überführt, dort mit 5,0 ml Bicarbonatpuffer pH 11 für 10 min. durch Schütteln reextrahiert.
Die überstehende Petroäther-Phase wird mittels fein ausgezogener Glaskapillare an der Wasserstrahlpumpe abgezogen und verworfen. Etwa 3 - 3,5 ml der alka-

lischen wässrigen Phase werden in geeignete Spitzgläser überführt und die Extinktion der Probe umgehend bei 242 nm bzw. 260 nm im Spektrometer gemessen (Quarzküvetten d = 10 mm).

2.2.1.1.3. Pufferlösungen

Phosphatpuffer pH 7,0:

26,38g KH_2PO_4 + 54,47g Na_2HPO_4 ad 1000 ml Aqua bidest.

Bicarbonatpuffer pH 11:

8,4g $NaHCO_3$ + 3,6g NaOH ad 1000 ml Aqua bidest.

2.2.1.1.4. Reinigung des benützten Petroläthers

1 x waschen mit 4% NaOH	20 Teile/1 Teil
1 x waschen mit 4% HCl	20 Teile/1 Teil
2 x waschen mit Aqua bidest.	20 Teile/1 Teil

2.2.1.1.5. Referenz

Phosphatpuffer pH 7,0, der als Reagenzleerwert in einen Inkubationsansatz gegeben und nach der oben beschriebenen Methode extrahiert worden war.

2.2.1.1.6. Eichkurve für die Hexobarbitalbestimmung

Verdünnungsstufen aus Hexobarbital im Bereich von 40-200 nMol/ml werden unter Zumischung mikrosomalen Proteins in oben beschriebener Weise nach BRODIE et al. (1953) extrahiert und deren Extinktion bei 242 bzw. 260 nm gegen einen RLW gemessen. Die Extink-

tionsdifferenzen werden gegen die entsprechenden Verdünnungsstufen des Hexobarbitals im Koordinatensystem aufgetragen. Die Eichkurve verläuft als Gerade (s. 2.2.1.1.6.2.).

2.2.1.1.6.1. Meßergebnisse der Eichwerte

Messung bei 242 nm und 260 nm zur Bildung der Extinktionsdifferenz $EE_{242-260}$

RLW bei $EE_{242-260}$: 0,034 (n = 2)

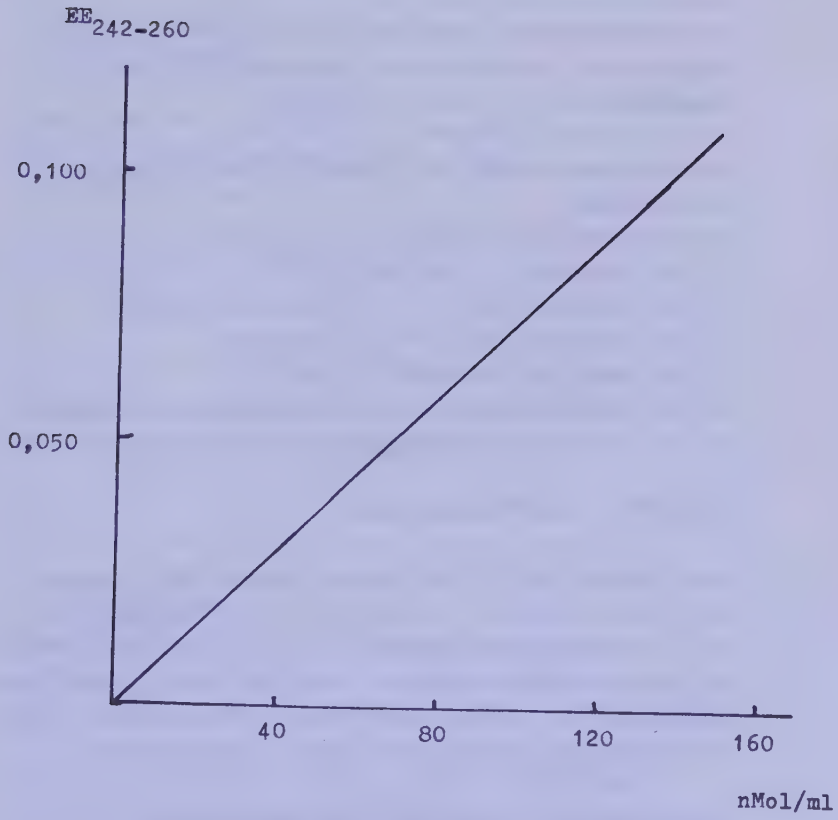
	Substratkonzentration (Hexobarbital) in nMol/ml					
	40	80	120	160	200	
1. Best.	0,027	0,058	0,088	0,123	0,148	$EE_{242-260}$
2. Best.	0,025	0,058	0,080	0,128	0,147	
Summe	0,052	0,116	0,168	0,251	0,295	
n	2	2	2	2	2	
$\bar{x}$ errechn. Eichl.	0,026	0,058	0,084	0,125	0,147	
$\bar{x}$ gez. Eichk.	0,029	0,058	0,088	0,117	0,147	

Berechnung des Umrechnungsfaktors von EE in nMol/ml:

Abgelesen von der Eichkurve:

0,100 $EE_{242-260}$ $\hat{=}$ 132 nMol/ml (Hexobarbital)

2.2.1.1.6.2. Eichkurve zur Hexobarbitalbestimmung nach BRODIE et al. (1953)



2.2.1.2. Inkubationsansätze in vitro

Als Substrat wurde verwendet:
Natriumsalz der N-Methyl-cyclohexyl-methyl-barbitursäure (Evipan-Na^{R}), MG: 258,3
Stammlösung: 25,8 mg Hexobarbital-Na/10 ml H_2O.

Es wurden folgende Substratkonzentrationen verwendet: 1,4; 1,8; 2,5; 4; 10 mM.

Hemmstoff Äthanol wurde gleichzeitig mit dem Substrat (nach Vorinkubation) aus einer Mikropipette zugeführt (10, 20 bzw. 50 µl/5ml).

Die Inkubationsansätze wiesen folgende Zusammensetzung auf:
In 25 ml Erlenmeyerkolben wurden gegeben:
1,0 ml Tris-HCl (25 mM; pH 7,5),
0,5 ml Isocitrat-Na_3 · 2 H_2O (0,08 M) (Serva),
0,5 ml NADP·Na_2 (0,01 M) (Boehringer),
0,5 ml $MgCl_2$ in Tris-HCl (50 mM),
2,0 ml Mikrosomensuspension (Proteingehalt 5mg/ml),
20 µl Isocitrat-Dehydrogenase (Boehringer);

bei 37°C 5 min. Inkubation.

Dann Zugabe von 0,5 ml Substratlösung (Endvolumen des Ansatzes jetzt 5,0 ml) und sofort Entnahme von 1 ml des kompletten Ansatzes als t_0-Wert, der direkt in den Petroläther gegeben wird zur Aufarbeitung nach BRODIE et al. (1953, siehe oben). Nach 10 min. wieder Entnahme von 1 ml des Ansatzes (t_{10}-Wert).

Jetzt erfolgt die Aufarbeitung und Extraktion nach BRODIE et al. (1953), wie oben beschrieben.

2.2.1.3. Auswertung

Die Extinktion der zur Zeit t_o (Anfangswert) und t_{10} (Wert nach 10 min.) entnommenen Proben werden jeweils gegen einen RLW bei 242 bzw. 260 nm gemessen. Dann wird die Extinktionsdifferenz $E_{242-260}$ beider Proben bestimmt und die Differenz der erhaltenen Extinktionsdifferenzen $EE_{242-260}$ errechnet. Das Ergebnis wird mit dem Eichkurvenfaktor (s.o.) multipliziert; man erhält nun die Differenz der Substratkonzentrationen (t_o-t_{10}) in nMol/ml (=Substratumsatz).
Die Umsatzgeschwindigkeit kann jetzt auf Grund des bekannten Proteingehaltes im Inkubationsansatz (s.o.) und der Inkubationsdauer in $nMol \cdot mgProtein^{-1} \cdot min^{-1}$ angegeben werden.

Beispiel für die Auswertung:

	t_o	t_{10}
E_{242}	1.150	.900
E_{260}	.415	.323
$E_{242-260}$	.735	.577

$EE_{242-260}$: .158

Da laut Eichkurve .100 $EE_{242-260}$ $\hat{=}$ 132 nMol/ml:

.158 $\hat{=}$ 208,5 (=Differenz der Substratkonzentration t_o-t_{10} in nMol/ml = Substratumsatz)

Umsatzgeschwindigkeit bei 2 mgProtein/ml und 10 min. Inkubation: 10,4 $nMol \cdot mgProtein^{-1} \cdot min^{-1}$

2.2.1.3.1. Ermittlung der K_m- und V_{max}-Werte von Hexobarbital

Die erhaltenen Werte werden nach entsprechender Umrechnung in ihre reziproken Werte (1/v) in ein doppelt reziprokes Diagramm nach Lineweaver-Burk eingetragen. Aus den Koordinatenpunkten wird die lineare Regression (SACHS, 1974) errechnet. Mit der erhaltenen Geraden wird dann der K_m- und V_{max}-Wert ermittelt. Aus in dieser Weise vier erhaltenen K_m- und V_{max}-Werten wurde der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) (SACHS,1974).

2.2.1.3.2. Ermittelter K_m- und V_{max}-Wert von Hexobarbital

	K_m (mM)	V_{max} ($nMol \cdot mgProtein^{-1} \cdot min^{-1}$)
Hexobarbital n = 4	0.19 ± 0.03	12,00 ± 0.9

2.2.1.3.3. Äthanolhemmversuche

Die unter Äthanoleinwirkung erhaltenen Werte werden ebenfalls in ein Lineweaver-Burk-Diagramm eingetragen. Zusätzlich wird im 1/v vs. (I)-Diagramm das Dixon-Diagramm gezeichnet.

2.2.1.4. Ergebnisse der Hexobarbitalinkubationen

2.2.1.4.1. Hexobarbital-Hydroxylierung: Ergebnis der Versuche zur K_m und V_{max} Bestimmung

Benützte Substratkonzentrationen (mM):
1,0; 0,4; 0,25; 0,18; 0,14 (=Endkonz. im Ansatz)

Versuch	s	1/s	$EE_{242-260}$	x Eichk.-Faktor (=v') 132	v	1/v
1.	0,97	1,03	0,158	208	10,4	0,10
	0,35	2,86	0,143	187	9,7	0,11
	0,20	5,00	0,103	135	6,8	0,15
	0,16	6,25	0,089	117	5,9	0,17
	0,13	7,69	0,082	108	5,4	0,19
2.	0,98	1,02	0,190	250	12,5	0,08
	0,35	2,86	0,124	163	8,1	0,12
	0,19	-	-	-	-	-
	0,16	6,25	0,091	112	5,6	0,18
	0,13	7,69	0,075	98	4,9	0,20
3.	0,83	-	-	-	-	-
	0,34	2,94	0,119	156	7,8	0,13
	0,16	6,25	0,067	88	4,4	0,23
	0,13	7,69	0,072	94	4,7	0,21
	0,10	10,0	0,058	76	3,8	0,26
4.	0,88	1,14	0,155	204	10,2	0,10
	0,31	3,23	0,130	171	8,2	0,12
	0,19	5,26	0,091	119	6,0	0,17
	0,15	6,67	0,076	100	5,0	0,20

s = gemessene Substratkonz. in der t_o-Probe (mM)
v'= Substratumsatz (nMol/ml) (t_o - t_{10})
v = Umsatzgeschwindigkeit ($nMol \cdot mgProtein^{-1} \cdot min^{-1}$)
$EE_{242-260}$ = Differenz der Extinktionsdifferenzen der Proben t_o und t_{10}

2.2.1.4.2. Hexobarbital-Hydroxylierung: Ergebnis in vitro mit Äthanol als Hemmstoff

Abb. 3

Benützte Substratkonzentrationen (mM): 1; 0,4; 0,25; 0,18; 0,14 (= Endkonzentration im Ansatz)

s	1/s	Äthanol (‰)	Äthanol (mM)	EE 242-260	x Eichk. Faktor 132 (=v')	v	1/v
0,98	1,02	-	-	0,190	250	12,5	0,08
0,95	1,05	1,34	30	0,155	204	10,2	0,10
0,91	1,10	1,94	42	0,193	254	12,7	0,08
0,35	2,86	-	-	0,124	163	8,1	0,12
0,36	2,78	1,30	29	0,104	137	6,8	0,15
0,30	3,33	2,30	50	0,089	177	5,8	0,17
0,19	5,26	-	-	0,071	93	4,6	0,21
0,23	4,35	1,54	34	0,102	134	6,7	0,15
0,20	5,00	2,23	49	0,085	112	5,6	0,18
0,16	6,25	-	-	0,091	119	6,0	0,17
0,17	5,88	1,60	35	0,085	112	5,6	0,18
0,14	7,14	1,97	43	0,068	89	4,4	0,22
0,13	7,69	-	-	0,075	98	4,9	0,20
0,13	7,69	1,58	34	0,075	98	4,9	0,20
0,11	9,09	1,78	39	0,065	85	4,2	0,23

MITTLERER Äthanolgehalt: 1,47‰ bzw. 32mM (n=5) ≙ 10 µl
2,04‰ bzw. 45mM (n=5) ≙ 20 µl

(Umrechnungsfaktor von ‰ auf mM: 21,8)

s = gemessene Substratkonz. in der t_o-Probe (mM)
v' = Substratumsatz (nMol/ml) ($t_o - t_{10}$)
v = Umsatzgeschwindigkeit ($nMol \cdot mgProtein^{-1} \cdot min^{-1}$)
$EE_{242-260}$ = Differenz der Extinktionsdifferenzen der Proben t_o und t_{10}

2.2.1.4.3. Hexobarbital-Hydroxylierung: Ergebnis in vitro mit Äthanol als Hemmstoff

Abb. 4

Benützte Substratkonzentrationen (mM): 1; 0,4; 0,25; 0,18; 0,14 (= Endkonzentration im Ansatz)

s	1/s	Äthanol (‰)	Äthanol (mM)	EE 242-260	x Eichk. Faktor 132 (=v')	v	1/v
0,83	1,20	-	-	0,095	125	6,2	0,16
0,94	1,06	1,38	30	0,093	122	6,1	0,16
0,79	1,27	2,91	63	0,106	139	6,9	0,14
0,94	1,06	5,75	125	0,087	114	5,7	0,17
0,34	2,94	-	-	0,119	156	7,8	0,13
0,34	2,94	1,27	28	0,107	141	7,0	0,14
0,32	3,13	2,94	64	0,116	152	7,6	0,13
0,35	2,86	6,28	137	0,087	114	5,7	0,17
0,16	6,25	-	-	0,067	88	4,4	0,23
0,19	5,26	1,55	34	0,073	96	4,8	0,21
0,18	5,56	2,68	58	0,081	106	5,3	0,19
0,22	4,55	6,02	131	0,096	126	6,3	0,16
0,13	7,69	-	-	0,072	94	4,7	0,21
0,16	6,25	1,54	34	0,084	110	5,5	0,18
0,14	7,14	2,96	65	0,076	100	5,0	0,20
0,12	8,33	4,49	98	0,046	60	3,0	0,33
0,10	10,0	-	-	0,058	76	3,8	0,26
0,11	9,10	1,46	32	0,052	68	3,4	0,29
0,10	10,0	2,95	64	0,052	68	3,4	0,29
0,12	8,33	5,09	111	0,061	80	4,0	0,25

mittlerer Äthanolgehalt: 1,4‰ bzw. 32mM (n=5) ≙ 10 µl
2,9‰ bzw. 63mM (n=5) ≙ 20 µl
5,5‰ bzw. 120mM (n=5) ≙ 50 µl

(Umrechnungsfaktor von ‰ auf mM: 21,8)

s = gemessene Substratkonz. in der t_o-Probe (mM)
v' = Substratumsatz (nMol/ml) (t_o - t_{10})
v = Umsatzgeschwindigkeit (nMol·mgProtein^{-1}·min^{-1})
$EE_{242-260}$ = Differenz der Extinktionsdifferenzen der Proben t_o und t_{10}

2.2.1.4.4. Hexobarbital-Hydroxylierung: Ergebnis in vitro mit Äthanol als Hemmstoff

Abb. 5

Benützte Substratkonzentrationen (mM): 1; 0,4; 0,25; 0,18; 0,14; (= Endkonzentration im Ansatz)

s	1/s	Äthanol (‰)	Äthanol (mM)	EE 242-260	x Eichk. Faktor 132 (v')	v	1/v
0,88	1,14	-	-	0,155	204	10,2	0,10
0,94	1,06	1,54	34	0,115	151	7,5	0,13
0,86	1,16	3,53	78	0,160	210	10,5	0,09
0,82	1,22	6,48	141	0,060	79	3,9	0,25
0,31	3,23	-	-	0,130	171	8,5	0,12
0,33	3,03	1,45	32	0,112	147	7,3	0,14
-	-	-	-	-	-	-	-
0,33	3,03	7,01	153	0,141	185	9,2	0,11
0,19	5,26	-	-	0,091	119	6,0	0,17
0,19	5,26	1,60	35	0,097	127	6,3	0,16
0,18	5,56	3,36	73	0,096	126	6,3	0,16
0,19	5,26	6,89	150	0,081	106	5,3	0,19
0,15	6,67	-	-	0,076	100	5,0	0,20
0,13	7,69	1,60	35	0,080	105	5,2	0,19
0,12	8,33	3,26	71	0,080	105	5,2	0,19
0,16	6,25	6,29	137	0,083	109	5,4	0,18
0,10	10,0	-	-	0,073	96	4,8	0,21
0,11	9,09	1,50	33	0,064	84	4,2	0,24
0,11	9,09	3,24	71	0,080	105	5,2	0,19
0,11	9,09	5,61	122	0,050	65	3,2	0,30

mittlerer Äthanolgehalt: 1,5‰ bzw. 34mM (n=5) ≙ 10 µl
3,3‰ bzw. 73mM (n=4) ≙ 20 µl
6,4‰ bzw. 141mM (n=5) ≙ 50 µl

(Umrechnungsfaktor von ‰ auf mM: 21,8)

s = gemessene Substratkonz. in der t_o-Probe (mM)

v' = Substratumsatz (nMol/ml) ($t_o - t_{10}$)

v = Umsatzgeschwindigkeit (nMol·mgProtein^{-1}·min^{-1})

$EE_{242-260}$ = Differenz der Extinktionsdifferenzen der Proben t_o und t_{10}

2.2.2. Inkubation von Pentobarbital

2.2.2.1. Bestimmung von Pentobarbital nach BREYER und VILLUMSEN (1975)

2.2.2.1.1. Prinzip der Methode

Pentobarbital wird mit destillierten Äther aus wässrigem Milieu extrahiert. Der Äther wird dann eingedampft, der Rückstand in Essigester gelöst und in ein kleineres Glas überführt, in dem dann andererseits der Essigester eingedampft wird. Mit Dichloräthan als geeignetem Lösungsmittel wird dann der Rückstand gelöst, definierte Mengen davon auf eine Kieselgelplatte (DC Fertigplatten Kieselgel 60, ohne Fluorescenzindikator; Fa. Merck, Darmstadt) gebracht und das im aufgelösten Rückstand enthaltene Pentobarbital chromatographisch von den übrigen Stoffen und Stoffwechselprodukten getrennt. Mit einem Chromatogramm -Spektralphotometer kann nun die Pentobarbitalmenge quantitativ gemessen werden.

2.2.2.1.2. Ausführung

1,0 ml des mikrosomalen Inkubationsansatzes, der Pentobarbital enthält, 2 ml Äther (dest.) und 400 mg $(NH_4)SO_4$ werden in einem etwa 10 ml fassendes Zentrifugalglas gut geschüttelt und 3 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Die gesamte überstehende Ätherphase wird mit Pasteurpipetten in ein etwa 10 ml fassendes, spitz zulaufendes Schliffglas gegeben. Der wässrigen Phase im Zentrifugenglas wird nochmals 2 ml Äther hinzugefügt, gut geschüttelt, und wiederum bei 3000 U/min zentri-

fugiert. Die überstehende Ätherphase wird ebenfalls in das Schliffglas zur vorher abpipettierten Phase gegeben. Der Äther wird dann in einem Rotationsverdampfer eingedampft. Das Schliffglas wird anschließend sorgfältig dreimal mit insgesamt 1,7 ml Essigester ausgespült, und zwar derart, daß immer ein Tropfen von oben nach unten der Wand des Glases entlang läuft, um so auch Pentobarbitalreste an der Innenwand des Schliffglases zu erfassen. Der Essigester, in dem jetzt das Pentobarbital gelöst ist, wird nun mit einer Pasteurpipette in ein kleines, etwa 2,5 ml fassendes, spitz zulaufendes Schliffglächen überführt und in einem Rotationsverdampfer eingedampft.
Der Rückstand wird in Dichloräthan gelöst, gut geschüttelt, so daß auch die Innenwände des Schliffgläschens gespült werden. Mit Kapillarpipetten, die definierte Mengen aufnehmen, wird ein Prozentsatz der Lösung auf die Kieselgelplatten (s.o.) aufgetragen. Der Prozentsatz ist dabei so gewählt, daß ca. 10 nMol aufgetragen werden. Die Kieselgelplatten waren einen Tag zuvor mit Fließmittel (s.u.) vorgewaschen und kurz vor dem Auftragen des Substrates 5 min. lang im Trockenschrank bei 120°C aktiviert worden.

Es werden neben vier Eichwerten fünf Versuchswerte aufgetragen. Die Platte wird nun an Luft getrocknet und anschließend in ein Fließmittel (s.u.) gebracht. Wenn die Front des Fließmittels etwa 10 cm gestiegen ist, wird die Platte aus dem Behälter genommen und 30 min. getrocknet. Danach wird mit einem Chromatogramm-Spektralphotometer (Zeiss) bei 220 nm gemessen, die Flächen der Ausschläge berechnet (s.u.) und an Hand der Eichwerte, die bei jeder Platte mitlaufen, der Pentobarbitalgehalt ermittelt.

2.2.2.1.3. Fließmittel

Als Fließmittel dient:
Chloroform (dest.) : 20 ml
Isopropanol (dest.) : 4 ml
in mit 25% NH_3 gesättigter Atmosphäre. Dies wird erreicht, indem man ca. 3 ml 25% NH_3 in eine Rinne gibt und diese zusammen in den mit Fließmittel beschickten Chromatographie-Tank einstellt.

2.2.2.1.4. Ermittlung der Peak-Flächen

Es wird hierzu nach der Dreiecksregel verfahren: Peak-Fläche = Peak-Höhe x Breite in halber Höhe.

2.2.2.1.5. Eichkurven für die Penicillinbestimmung

Um die mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer gemessenen Werte (mm^2) in den eigentlichen Penicillingehalt umzurechnen, werden auf jeder Platte vier verschiedene Mengen einer Standardlösung, deren Penicillingehalt zuvor bestimmt worden war (s.u.), aufgetragen. Die erhaltenen Werte werden gegen den entsprechenden Penicillingehalt in ein Koordinatensystem gezeichnet. Die Blankwerte - für jede Platte eine eigene Blankwerte - verlaufen als Geraden.

2.2.2.1.5.1. Herstellung einer Standardlösung

Ziel ist eine Penicillinkonzentration von etwa 1 mM. Hierzu wird eine wässrige Penicillin-Na-Stamm-

lösung von 10 mM (≙ 2,6 mg/ml) hergestellt. Davon werden 300 µl in ein Zentrifugenglas pipettiert, dazu 300 µl KH_2PO_4 (1 M) und 3 ml Dichloräthan. Dann wird gut durchgeschüttelt, wobei das Pentobarbital nun aus dem wässrigen Milieu von Dichloräthan extrahiert wird. Dann wird zentrifugiert, die untere Dichloräthanphase sorgfältig mit einer Pasteurpipette in ein Zwischenglas gegeben, und zwar der Innenwand entlang abtropfend, um so jeglichen Wasserrest zu eliminieren. Danach wird nun die völlig wasserfreie Lösung in ein Schliffglas überführt, in dem es im Kühlschrank aufbewahrt wird.

2.2.2.1.5.2. Bestimmung des Pentobarbitalgehaltes der Standardlösung

Vor jeder Verwendung der Standardlösung wird stets der eigentliche Pentobarbitalgehalt bestimmt. Damit wird dem Umstand, daß Dichloräthan leicht verdunstet und so den Substratgehalt/ml erhöht, Rechnung getragen.

Es wird folgendermaßen vorgegangen:

0,2 ml der Standardlösung (s.o.) werden in einem Rotationsverdampfer eingedampft. Der Rückstand wird in genau 3 ml Boratpuffer (0,02 M, pH 9) gelöst und dessen Extinktion gegen reinen Boratpuffer bei 240 und 260 nm im Spectrometer gemessen.
An Hand eines Eichfaktors kann nun der genaue Substratgehalt errechnet werden. Durch vorhergegangene Extinktionsmessungen einer Boratpufferlösung mit genau definiertem Pentobarbitalgehalt konnte folgender Eichfaktor ermittelt werden:

100 $EE_{240-260\ nm}$ = 14 nMol Pentobarbital/ml
= 42 nMol Pentobarbital/ 3 ml
Eichfaktor: 42

Bei der Berrechnung des Pentobarbitalgehaltes muß beachtet werden, daß nur 0,2 ml Standardlösung zur Substratgehaltbestimmung verwendet wurden. Um auf den Substratgehalt/ml Standardlösung zu kommen, muß das Ergebnis (Eichfaktor x gemessene 100-Extinktionsdifferenzen) mit 5 multipliziert werden.

Rechenbeispiel:

	240	260	EE
3 ml Boratpuffer mit Pentobarbital aus 0,2 ml St.-Lös.	.470	.078	.392

$EE_{240-260}$ x Eichfaktor = 164,6 (≙ Substratgehalt in nMol/0,2 ml Standardlösung.)

164,6 x 5 = 823 (≙ Substratgehalt in nMol/ml St.-Lös.)

1ml Standardlösung enthält also 823 nMol Pentobarbital.

2.2.2.2. Inkubationsansätze in vitro

Als Substrat wurde verwendet:
Natriumsalz der 5-Äthyl-5-(1-methyl-butyl)-barbitursäure = Pentobarbitalnatrium (Nembutal^{R}), MG: 248,3

Es wurden folgende Substratkonzentrationen verwendet:
1; 0,5; 0,25; 0,14; 0,1 mM.

Hemmstoff Äthanol wurde gleichzeitig mit dem Substrat (nach der Vorinkubation) aus einer Mikropipette zugefügt (20 bzw. 50 µl/5ml).

Die Inkubationsansätze wiesen diesselben Zusammensetzung auf wie bei den in vitro Versuchen mit Hexobarbital (s. 2.2.1.2.).

Nach fünfminütiger Inkubation bei 37°C Zugabe von 0,5 ml Substratlösung (Endvolumen des Ansatzes jetzt 5,0 ml) und sofort Entnahme von 1 ml des kompletten Ansatzes als t_o-Wert, der direkt in ein Glas mit 400 mg $(NH_4)SO_4$ und 2 ml Äther gegeben wird. Nach 20 min. wieder Entnahme von 1 ml (bei Konzentrationen unter 0,5 mM 2 ml) des Ansatzes.

Jetzt erfolgt die Aufarbeitung und Extraktion nach BREYER und VILLUMSEN (1975), wie oben beschrieben.

2.2.2.3. Auswertung

Die Flächen der Peaks der zur Zeit t_o und t_{20} entnommenen Proben werden bestimmt (s.o.). An Hand der Eichkurven werden die Werte in nMol umgerechnet und, da nur ein bestimmter Prozentsatz auf die Platten aufgetragen wurde, auf 100% ergänzt. Das Ergebnis wird unter Berücksichtigung der prozentualen Extraktion (s.u.) auf den Endwert korrigiert und in nMol/ml ausgedrückt. Die Differenz der Substratkonzentration (nMol/ml) der zur Zeit t_{20} entnommenen Proben gegenüber t_o (Anfangswert) wird bestimmt (= Substratumsatz). Die Umsatzgeschwindigkeit wird angegeben in $nMol \cdot mgProtein^{-1} \cdot min^{-1}$.

2.2.2.3.1. Berechnung der prozentualen Extraktion

Drei Verdünnungsstufen aus Pentobarbital wurden in elf Ansätzen unter Zumischung inaktiven mikrosomalen

Proteins in oben beschriebener Weise nach BREYER und VILLUMSEN (1975) extrahiert und deren nMol-Gehalt nach der Eichkurve berechnet. Der Ist-Wert wurde als prozentuale Extraktion des Soll-Wertes ausgedrückt. Dann wurde der Mittelwert aus den erhaltenen elf Extraktionswerten gebildet, um ihn als Korrekturfaktor für die folgenden Versuche zu benützen.
Folgender Mittelwert wurde ermittelt (n=11; $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$):

88% ± 3

Die in den Versuchen erhaltenen Werte wurden nun alle als 88% angesehen und mit dem Faktor 1,14 auf 100% korrigiert.

2.2.2.3.2. Ermittlung der K_m- und V_{max}-Werte von Pentobarbital

Wie bei Hexobarbital (s. 2.2.1.3.1.).

2.2.2.3.3. Ermittelter K_m- und V_{max}-Wert von Pentobarbital

	K_m (mM)	V_{max} (nMol·Prot.$^{-1}$·min^{-1}
Pentobarbital (n=5)	0,16 ± 0,02	2,38 ± 0,18

2.2.2.3.4. Äthanolhemmversuche

Wie bei Hexobarbital (s. 2.2.1.3.3.)

2.2.2.4. Ergebnisse der Pentobarbitalinkubationen

2.2.2.4.1. Pentobarbital-Hydroxylierung: Ergebnis der Versuche zur K_m- und V_{max}-Bestimmung

(Hauptbeispiel zur Auswertung)
Benützte Substratkonz. (mM): 0,1; 0,05; 0,025; 0,01 (= Endkonz. im Ansatz)

	E	A	mm^2	nMol	100%	xFakt. 1,14	s	1/s	c/ml	v'	v	1/v
t_o	1	10	529	8,8	88	100	0,10	10,0	100	34	0,85	1,1
t_{20}	1	10	361	5,8	58	66	-	-	66			
t_o	1	20	545	9,1	45,5	51	0,051	20,0	51	19	0,48	2,08
t_{20}	1	20	346	5,6	28	32	-	-	32			
t_o	1	40	544	8,6	21,5	24	0,024	41,6	24	11	0,28	3,57
t_{20}	2	20	299	4,6	23	26	-	-	13			
t_o	1	100	570	9,0	9,0	10	0,01	100	10	5,5	0,14	7,14
t_{20}	2	60	315	4,8	8,0	9	-	-	4,5			

E = die dem Inkub.-Ansatz entnommene Menge (ml)
A = die Auftragmenge auf die Kieselgel-Platte (% der extrahierten Menge)
mm^2 = Fläche der Pentobarbital-Peaks (mm^2)
nMol = Messergebnis in nMol, der Eichkurve entsprechend
100% = da nur ein bestimmter Prozentsatz (A) aufgetragen und somit gemessen wurde, Umrechnung auf 100%
xFakt. = Korrektur mit Faktor 1,14, da bei Wiedergewinnungsversuchen nur 88% gefunden
s = gemessene Substratkonz. in der t_o-Probe (mM)
c/ml = Substratkonz. in nMol/ml
v' = Substratumsatz (nMol/ml) ($t_o - t_{20}$)
v Umsatzgeschwindigkeit ($nMol \cdot mgProtein^{-1} \cdot min^{-1}$)

In den folgenden Tabellen werden nur noch s, 1/s, v', v und 1/v aufgeführt.

2.2.2.4.2. Versuch Nr. 2 - 5 (Pentobarbital/K_m u. V_{max})

Versuch	s	1/s	v'	v	1/v
2.	0,098	10,2	35	0,88	1,14
	0,051	-	-	-	-
	0,024	41,6	13	0,32	3,13
	0,013	76,9	6	0,15	6,66
3.	0,100	10,0	38	0,95	1,05
	0,046	21,5	17	0,42	2,35
	0,026	38,6	18	0,45	2,22
	0,014	69,4	9	0,22	4,54
	0,010	100	6	0,15	6,66
4.	0,092	10,9	37	0,93	1,08
	0,050	20,0	19	0,48	2,08
	0,023	43,5	13	0,32	3,13
	0,014	71,4	9	0,22	4,54
	0,008	-	-	-	-
5.	0,093	10,8	39	0,97	1,03
	0,048	20,9	26	0,65	1,54
	0,023	43,5	14	0,35	2,86
	0,020	50,0	13	0,32	3,13
	0,011	92,6	7	0,18	5,56

s = gemessene Substratkonz. in der t_o-Probe (mM)
v' = Substratumsatz (nMol/ml) (t_o - t_{20})
v = Umsatzgeschwindigkeit (nMol·mgProtein^{-1}·min^{-1})

2.2.2.4.3. Pentobarbital-Hydroxylierung: Ergebnis in vitro mit Äthanol als Hemmstoff

Abb. 6

Benützte Substratkonzentrationen (mM): 0,1; 0,05; 0,025; 0,014; 0,01 (= Endkonz. im Ansatz)

Äthanolmenge im Ansatz: 20 µl

s	1/s	Äthanol (‰)	Äthanol (mM)	v'	v	1/v
0,100	10	-	-	38	0,95	1,05
0,100	10	2,6	57	22	0,55	1,82
0,047	21,5	-	-	17	0,42	2,35
0,046	21,7	2,3	50	14	0,35	2,86
0,026	38,6	-	-	14	0,35	2,86
0,023	43,5	2,6	57	9	0,22	4,54
0,014	71,4	-	-	9	0,22	4,54
0,013	78,7	2,9	63	5	0,13	7,69
0,010	97,1	-	-	6	0,15	6,66
0,009	103	2,5	55	4	0,10	10

mittlerer Äthanolgehalt (n=5): 2,6‰ bzw. 57 mM
(Umrechnungsfaktor von ‰ auf mM: 21,8)

s = gemessene Substratkonz. in der t_o-Probe (mM)
v' = Substratumsatz (nMol/ml) ($t_o - t_{20}$)
v = Umsatzgeschwindigkeit (nMol·mgProtein^{-1}·min^{-1})

2.2.2.4.4. Pentobarbital-Hydroxylierung: Ergebnis in vitro mit Äthanol als Hemmstoff

Abb. 7

Benützte Substratkonzentrationen (mM): 0,1; 0,05; 0,025; 0,014; 0,01 (= Endkonz. im Ansatz)

Äthanolmenge im Ansatz: 20 µl

s	1/s	Äthanol (‰)	Äthanol (mM)	v'	v	1/v
0,083	12,1	-	-	24	0,60	1,67
0,082	12,2	2,6	57	18	0,45	2,22
0,047	21,3	-	-	20	0,50	2,00
0,046	21,7	2,9	63	16	0,40	2,50
0,025	40,0	-	-	12	0,30	3,23
0,023	43,5	2,4	52	8	0,20	5,00
0,018	55,6	-	-	10	0,25	4,00
0,018	-	-	-	-	-	-
0,015	66,7	-	-	8	0,20	5,00
0,014	71,4	2,5	55	6	0,15	6,66

mittlerer Äthanolgehalt (n=4): 2,6‰ bzw. 57 mM
(Umrechnungsfaktor von ‰ auf mM: 21,8)

s = gemessene Substratkonz. in der t_o-Probe (mM)
v' = Substratumsatz (nMol/ml) (t_o - t_{20})
v = Umsatzgeschwindigkeit (nMol·mgProtein^{-1}·min^{-1})

2.2.2.4.5. Pentobarbital-Hydroxylierung: Ergebnis in vitro mit Äthanol als Hemmstoff

Abb. 8

Benützte Substratkonzentrationen (mM): 0,1; 0,05; 0,025; 0,014; 0,01 (= Endkonz. im Ansatz)

Äthanolmenge im Ansatz: 50 µl

s	1/s	Äthanol (‰)	Äthanol (mM)	v'	v	1/v
0,092	10,9	-	-	37	0,93	1,08
0,092	10,9	5,1	111	10	0,25	4,00
0,050	20,0	-	-	19	0,48	2,08
0,047	-	-	-	-	-	-
0,023	43,5	-	-	13	0,32	3,13
0,023	43,5	5,0	109	7	0,18	5,56
0,014	71,4	-	-	9	0,22	4,54
0,013	76,9	5,4	118	5	0,13	7,69
0,008	125	-	-	5	0,13	7,69
0,009	111	4,2	92	3	0,08	12,5

mittlerer Äthanolgehalt (n=4): 5,0 ‰ bzw. 108 mM
(Umrechnungsfaktor von ‰ auf mM: 21,8)

s = gemessene Substratkonz. in der t_o-Probe (mM)
v' = Substratumsatz (nMol/ml) ($t_o - t_{20}$)
v = Umsatzgeschwindigkeit (nMol·mgProtein^{-1}·min^{-1})

2.2.2.4.6. Pentobarbital-Hydroxylierung: Ergebnis in vitro mit Äthanol als Hemmstoff

Abb. 9

Benützte Substratkonzentrationen (mM): 0,1; 0,05; 0,025; 0,014; 0,01 (= Endkonz. im Ansatz)

Äthanolmenge im Ansatz: 50 µl

s	1/s	Äthanol (‰)	Äthanol (mM)	v'	v	1/v
0,092	10,8	-	-	39	0,97	1,03
0,096	10,4	4,7	102	16	0,40	2,50
0,048	20,9	-	-	26	0,65	1,54
0,047	21,3	4,9	107	13	0,32	3,13
0,023	43,4	-	-	14	0,35	2,86
0,025	40,0	5,0	109	9	0,22	4,54
0,020	50,0	-	-	14	0,35	2,86
0,020	50,0	5,0	109	8	0,20	5,00
0,011	90,8	-	-	7	0,18	5,56
0,011	90,8	5,2	113	4	0,10	10,0

mittlerer Äthanolgehalt (n=5): 5,0‰ bzw. 108 mM
(Umrechnungsfaktor von ‰ auf mM: 21,8)

s = gemessene Substratkonz. in der t_o-Probe (mM)
v' = Substratumsatz (nMol/ml) (t_o - t_{20})
v = Umsatzgeschwindigkeit (nMol·mgProtein^{-1}·min^{-1})

2.2.3. Umsetzungen von Hexobarbital nach der Methode von BREYER und VILLUMSEN (1975)

Ausführung wie für Pentobarbital beschrieben. Die prozentuale Extraktion betrug für Hexobarbital jedoch 84% ± 2 ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$), so daß hier mit dem Faktor 1,19 korrigiert wurde.

2.2.3.1. Bestimmung von K_m und V_{max}

Die erhaltenen Meßwerte werden auch hier nach entsprechender Umrechnung in ihre reziproken Werte in ein doppelt reziprokes Diagramm nach Lineweaver-Burk eingetragen. Aus den Koordinatenpunkten wird die lineare Regression errechnet (SACHS, 1974). Mit der erhaltenen Geraden kann nun der K_m- und V_{max}-Wert ermittelt werden.

2.2.3.1.1. Ermittelter K_m- und V_{max}-Wert

	K_m (mM)	V_{max} ($nMol \cdot mgProtein^{-1} \cdot min^{-1}$)
Hexobarbital	0,14	16,3

2.2.3.1.2. Ergebnis (K_m u. V_{max})

Benützte Substratkonzentrationen (mM): 0,5; 0,25; 0,20; 0,14; 0,10 (= Endkonz. im Ansatz)

s	1/s	v'	v	1/v
0,489	2,05	132	13	0,077
0,252	3,97	110	11	0,091
0,188	5,31	88	9	0,111
0,139	7,19	77	8	0,125
0,098	10,16	71	7	0,142

s = gemessene Substratkonz. in der t_o-Probe (mM)
v' = Substratumsatz (nMol/ml) (t_o - t_{20})
v = Umsatzgeschwindigkeit (nMol·mgProtein^{-1}·min^{-1})

2.2.3.2. Äthanolhemmversuch von Hexobarbital mit niedriger Substratkonzentration nach der Methode von BREYER und VILLUMSEN (1975)

Abb. 10

Benützte Substratkonzentrationen (mM): 0,2; 0,18; 0,10 (= Endkonz. im Ansatz)

Äthanolmenge: 50 µl

s	1/s	Äthanol (‰)	Äthanol (mM)	v'	v	1/v
0,194	5,16	-	-	94	9,4	0,106
0,199	5,03	5,8	127	86	8,6	0,116
0,167	5,99	-	-	88	8,8	0,114
0,179	5,59	6,4	140	71	7,1	0,141
0,098	10,16	-	-	71	7,1	0,141
0,094	10,64	6,4	139	59	5,9	0,169

mittlerer Äthanolgehalt (n=3): 6,2‰ bzw. 135 mM
(Umrechnungsfaktor von ‰ auf mM: 21,8)

s = gemessene Substratkonz. in der t_o-Probe (mM)
v' = Substratumsatz (nMol/ml) (t_o - t_{20})
v = Umsatzgeschwindigkeit (nMol·mgProtein^{-1}·min^{-1})

2.2.4. Parallelverlaufender Hemmversuch mit Äthanol von Hexobarbital und Pentobarbital nach der Methode von BREYER und VILLUMSEN (1975) mit gleicher Substratkonzentration (Ergebnis)

Abb: 11
Substratkonzentration: 0,09 mM
Äthanolmenge im Ansatz: 20 µl

2.2.4.1. Hexobarbital mit Äthanol

Inkubationszeit: 5 min.

s	Äthanol (‰)	Äthanol (mM)	v'	v	1/v
0,097	-	-	59	5,9	0,169
0,094	-	-	56	5,6	0,178
0,090	-	-	59	5,9	0,169
0,090	3,4	73	59	5,9	0,169
0,090	3,2	70	59	5,9	0,169
0,094	3,2	70	59	5,9	0,169

mittlerer Äthanolgehalt (n=3): 3,3‰ bzw. 71 mM
(Umrechnungsfaktor von ‰ auf mM: 21,8)

s = gemessene Substratkonz. in der t_o-Probe
v' = Substratumsatz (nMol/ml) ($t_o - t_5$)
v = Umsatzgeschwindigkeit (nMol·mg Protein^{-1}·min^{-1})

2.2.4.2. Pentobarbital mit Äthanol

Abb. 11
Inkubationszeit: 20 min.

s	Äthanol (‰)	Äthanol (mM)	v'	v	1/v
0,090	-	-	40	1,00	1,000
0,090	-	-	39	0,98	1,020
0,086	-	-	37	0,93	1,075
0,086	2,9	63	28	0,70	1,428
0,089	2,9	63	32	0,80	1,250
0,090	2,5	54	32	0,80	1,250

mittlerer Äthanolgehalt (n=3): 2,8‰ bzw. 60 mM
(Umrechnungsfaktor von ‰ auf mM: 21,8)

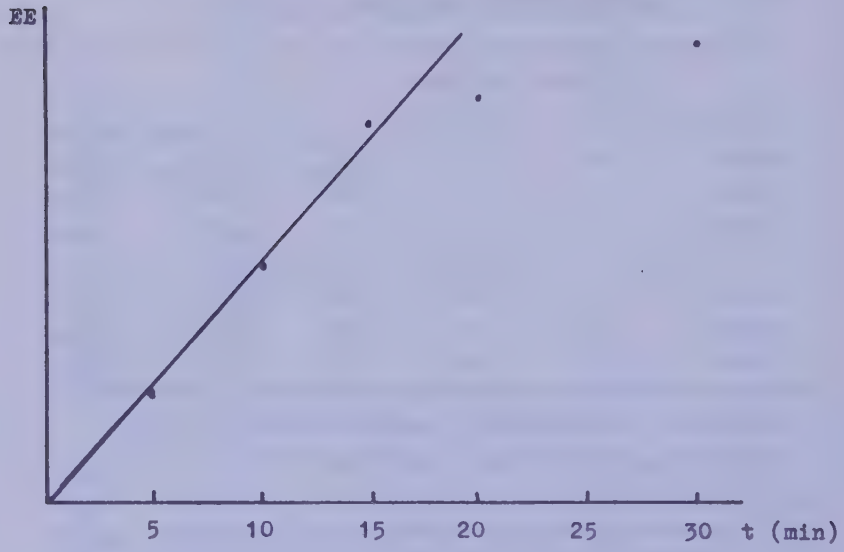
s = gemessene Substratkonz. in der t_o-Probe
v' = Substratumsatz (nMol/ml) (t_o - t_{20})
v = Umsatzgeschwindigkeit ($nMol \cdot mgProtein^{-1} \cdot min^{-1}$)

Signifikanz der Pentobarbitalhemmung durch Äthanol:

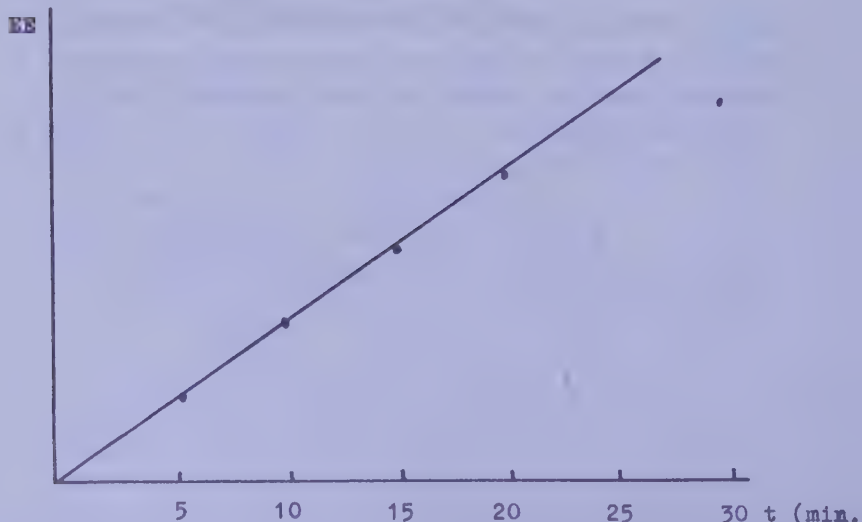
Nach dem t-Test ist der Abbau-Unterschied von Pentobarbital ohne-mit Äthanol auf dem 5%-Niveau signifikant ($p < 0,05$).

2.2.5. Linearität der Abbaurate von Hexobarbital und Pentobarbital innerhalb der benutzten Versuchsdauer

2.2.5.1. Hexobarbital (t= 5 bzw. 10 min.)



2.2.5.2. Pentobarbital (t= 20 min.)



2.3. Enzymatische Alkoholbestimmung der Ansätze in vitro

Um den exakten Äthanolgehalt der Ansätze in vitro für die Hemmversuche zu bestimmen, wird die Biochemica Test Combination für Blutalkohol der Firma Boehringer Mannheim benützt.

2.3.1. Prinzip der Methode nach BÜCHER et al. (1951)

Die enzymatische Oxidation (Dehydrogenierung) von Äthanol durch Alkoholdehydrogenase, die im Organismus den oxidativen Abbau des zugeführten Äthanols einleitet, läuft unter bestimmten Bedingungen auch in vitro ab unter Übertragung von Wasserstoff auf das Diphosphopyridin-nucleotid (Nikotinsäure-Adenin-diphosphonukleotid, NAD). Es wird hierbei eine stöchiometrische Menge reduzierten NAD (NAD-H) gebildet. Diese Reaktion verläuft unter Einwirkung von Alkoholdehydrogenase reversibel, wobei bis zum Gleichgewicht Acetaldehyd gebildet wird.

$$C_2H_5OH + NAD^+ \rightleftharpoons CH_3COH + NAD\text{-}H + H^+$$

Durch Abfangen des Acetaldehyds mit Semicarbazid kann die Reaktion jedoch irreversibel nach rechts verlaufend gestaltet werden. Mit Umsetzung des Äthanols läuft die Bildung des NADH-H parallel; die Zunahme der Extinktion dieses H-Rezeptors (bei 340 nm gemessen) wird als Meßgröße für den H-Atom Umsatz bzw. nach Ablauf der Reaktion für den Gehalt an Äthanol in der Probe benutzt.
Grundlage dieser Meßmethodik ist das unterschiedliche Absorptionsspektrum von NAD und NAD-H (Prinzip nach Warburg).

2.3.2. Ausführung

Entsprechend der Alkohol-Testkombination der Biochemica Boehringer Mannheim (Nr. 15425).

0,5 ml des Ansatzes (bzw. 0,1 ml) werden in 4,0 ml (bzw. 0,8 ml) 0,33 N-Perchlorsäure (2,9 ml 70 %ige $HCLO_4$ ad 100 ml) in ein Zentrifugengläschen pipettiert, durch Schütteln gründlich gemischt und zentrifugiert.
In ein neues verschließbares Reagenzglas wird dann einpipettiert:

4,80 ml Pufferlösung pH 8,7 (s.u.)
0,10 ml NAD-Lösung
0,10 ml des klaren Überstandes nach der Enteiweißung und Zentrifugierung
0,02 ml ADH-Suspension.

Die Mischung wird verschlossen bei 25°C für 70 min (bzw. bei 37°C für 25 min) inkubiert. Anschließend wird die Extinktion der Probe bei 340 nm im Spektrophotometer gegen einen Reagentienleerwert gemessen, der statt 0,10 ml enteiweißter Probe 0,10 ml Perchlorsäure-Lösung enthält. Dieser Blindwert soll gegen Luft eine Extinktion von 0,150 bei 340 nm nicht überschreiten.

2.3.3. Pufferlösungen

Es werden vorgefertigte Pufferlösungen der Blutalkohol-Testkombination der Firma Boehringer Mannheim verwendet.

2.3.4. Herstellung einer Eichkurve

Zur Eichkurvenherstellung wurden Standardlösungen der Firma Merck (Darmstadt) benutzt.

Von diesen Standardlösungen wurden Verdünnungsstufen hergestellt, die nach der in 2.3.2. beschriebenen Weise behandelt wurden, d.h. deren Athanolgehalt enzymatische bestimmt wurde.

Nach Messung bei 340 nm gegen einen Reagentienleerwert wurden die erhaltenen Meßdaten gegen die entsprechenden Äthanolgehalte (0,18 - 1,8 %o) im Koordinatensystem aufgetragen. Die Eichkurve verläuft als Gerade.

Der Umrechnungsfaktor zu Berechnung von EE in %o wurde von der Eichkurve abgelesen:

$0{,}100\ EE_{340} = 0{,}34$ %o Äthanol in der Probe.

Literaturverzeichnis

ALQUIST,R.P.; and DILLE,J.M.:
Reactions of alcohol tolerant rabbits to Pentobarbital, Evipal, Ether, Amidopyrine and Metrazol.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 70, 301-308 (1940)

ARNOLD,W:
Plötzliche Todesfälle unter kombinierter Schlafmittel-Alkohol-Einwirkung.
Kriminalistik 10, (1966)

BATTEGAY,R.; MÜHLEMANN,R.; HELL,D.; ZEHNDER,R.; HOCH,D.; und DILLINGER,A.:
Alkohol,Tabak und Drogen im Leben des jungen Mannes.
Vol.14, Sozialmed. und Pädagog. Jugendkunde,
ed. B.Ritzel,
S. Karger Verlag, Basel 1977

BESSERER,K.; MALLACH,H.J.; SCHOENE,D.:
Der Einfluß von Äthylalkohol auf die Pharmakokinetik von N,N-Dimethyl-dibenzo(b,f,)thiepin-10-methyl-amin-HCL (GP 41 299) beim Menschen.
Arzneimittel-Forsch. 22, 932-937 (1972)

BIERINGER,G.M.; MÜHLBERT,F.M.; SCHMUTZ,E.W.; und SCHMIDT,F.:
Drogen-, Tabak- und Alkoholkonsum Mannheimer Oberschüler.
Med. Welt 27, 1643-47 (1976)

BIRKETT,D.J.:
Interaction of some drugs, metal ions, and alcohols with rat liver microsomes as studied with a fluorescent probe.
Clin. Exp. Pharm. Phys. 1, 415-427 (1974)

BREYER,U.; VILLUMSEN,D.:
Thin-Layer chromatographic determination of barbiturates and phenytoin in serum and blood.
J. Chrom. 115, 493-500 (1975)

BRODIE,B.B.; BURNS,J.J.; MARK,L.C.; LIEF,P.A.; BERNSTEIN,E.; and POPPER,E.M.:
The fate of pentobarbital in man and dog and a method for its estimation in biological material.
J. Pharm. Exp. Ther. 109, 26-34 (1953)

BRODIE,B.B.; GILLETTE,J.R.:
Concepts in Biochemical Pharmacology.
Handbuch der experimentellen Pharmakologie.
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York,
Vol. 28/2 (1971)

BÜCHER,Th.; und REDETZKI,K.:
Eine spezifische photometrische Bestimmung von Äthylalkohol auf fermentativem Wege.
Klin. Wschr. 29, 615-616 (1951)

BÜTTNER,H.:
Arzneimittel und Alkohol.
Ther. d. Gegenwart 99, 384-386 (1960)

BÜTTNER,H.; PORTWICH,F.; ENGELHARDT,K.:
Der DPN- und DPN-H Gehalt der Rattenleber während des Abbaus von Äthanol und seine Beeinflussung durch Sulfonylharnstoff und Disulfiram.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak.
240, 573-583 (1961)

CALDWELL,J.; and SEVER,P.S.:
The biochemical pharmacology of abused drugs.
II. Alcohol and barbiturates.
Clin. Pharm. Ther. 16, 737-749 (1974)

CARRIÈRE,G.; HURIEZ,C.; and WILLIQUET,P.:
Etude expérimentale des injections intraveineuses d'alcohol au cours d'intoxications par le Gardénal.
Compt. Rend. Soc. Biol. 116, 188-190 (1934)

COHEN,G.M.; MANNERING,G.J.:
Involvement of a hydrophobic site in the inhibition of the microsomal p-hydroxylation of anilin by alcohols.
Mol. Pharmacol. 9, 383-397 (1973)

COLDWELL,B.B.; WIBERG,G.G.; and TRENHOLM,H.L.:
Some effects of ethanol on the toxicity and distribution of barbiturates in rats.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 48, 254-264 (1970)

COLDWELL,B.B.; PAUL,C.L.; and THOMAS,B.H.:
Phenobarbital metabolism in ethanol-intoxicated rats.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 51, 458-463 (1973)

DATZ,B.; SCHUPPEL,R.:
Zur Wirkung oraler Antidiabetika beim Kaninchen unter akuter Äthanolbelastung.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Exp.Pharmak. 269, 461 (1971)

DAWES,E.A.:
Quantitative Problems in Biochemistry.
Fifth Edition, Churchill Livingstone,
Edinburgh & London, pp.215-218, (1972)

ELBEL,H.:
Neues zur Blutalkoholfrage.
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 30, 219-226 (1938-39)

ELBEL,H.; und SCHLEYER,F.:
Blutalkohol.
2. Aufl., Thieme Verlag Stuttgart (1956)

ESTLER,C.J.:
Psychopharmaka. Übersicht und Klassifizierung.
Zt. Allgemein. Med. 51, 405-417 (1975)

FORNEY,R.B.; and HUGHES,F.W.:
Combined effects of alcohol and other drugs.
Thomas, Springfield (III), (1968)

GILLETTE,J.R.:
Metabolism of drugs and other foreign compounds
by enzymatic mechanisms.
Prog. Drug. Res. 6, (ed. E.Jucker), Birkhäuser
Basel (1963)

GILLETTE,J.R.; DAVIS,D.C.; SASAME,H.A.:
Cytochrom-P-450 and its role in drug metabolism.
Ann. Rev. Pharm. 12, 57-84 (1972)

GOLDBERG,L.:
Alcohol, CNS-active drugs and driving skill.
IV. Inter. Kongreß für Hyg. and Prae.-Med.
Wien, 369-371 (1965)

GOLDBERG,L.; RYDBERG,N.:
Inhibition of ethanol metabolism in vivo by ad-
ministration of pyrazole.
Biochem. Pharmacol. 18, 1749-1762 (1969)

GOODMAN,L.; and GILMAN,A.:
The pharmacological basis of therapeutics.
The MacMillan Company, New York, 1575-1608 (1965)

GÖRES,E.:
Einige pharmakologische Probleme der Äthanol-
einwirkung.
Pharmazie, 19, 433-489 (1964)

GRUBER,C.M.:
A theoretical consideration of additive and potentiating effects between drugs with a practical example using alcohol and barbiturates.
Arch. Int. Pharmacodyn. 102, 1732 (1955)

HAACKE,H.; JOHNSON,K.; and KOLENDA,K.D.:
Interaction of pentobarbital, diphenylhydantoin and digitoxin with ethanol in the isolated perfused Guinea-pig liver.
Arzneim. Forsch. 26, Nr.5, 835-839 (1976)

HALD,J.; JACOBSON,E.; and LARSEN,V.:
Formation of acetaldehyd in the organism in relation to dosage of antabuse and to alcohol concentration in blood.
Acta Pharm. Int. (126 h), 5, 179-188 (1949)

HAUSCHILD,F.:
Pharmakologie und Grundlagen der Toxikologie.
2. Aufl., VEB Thieme Verlag Leipzig (1960)

HO CHUNG and BROWN,D.R.:
Mechanism of the effect of acute ethanol on hexobarbital metabolism.
Bioch. Pharm. 25, 1613-1616 (1976)

HOLLISTER,L.E.; GILLESPITE,H.K.; and CALLIF,P.A.:
Marihuana, ethanol and dextroamphetamine.
Arch. Gen. Psychiat. 23, 199-203 (1970)

HRYCAY,E.G.; and PROUGH,R.A.:
Reducted nicotinamide adenine dinucleotide-cytochrome b_5 reductase and cytochrome b_5 as electron carriers in NADH-supported cytochrome P-450-dependent enzyme activities in liver microsomes.
Arch. Bioch. Biophys. 165, 331-339 (1974)

IM OBERSTEG,J. und BÄUMLER,J.:
Unfälle unter der Einwirkung von Arzneimitteln und Alkohol.
Schweiz. Med. Wschr. 97, 1039-1042 (1967)

JACOBSON,E.:
The metabolism of ethylalcohol.
Pharmacol. Rev. 4, 107-135 (1952)

JETTER,W.W.; and MCLEAN,R.:
Poisoning by the synergistic effect of phenobarbital and ethyl-alcohol.
Arch. Path. 36, 112-122 (1943)

KHANNA,J.M.; KALANT,H.; LOTH,J.; and SEYMOUR,F.:
Effect of 4-methylpyrazole and pyrazole on the induction of fatty liver by a single dose of ethanol.
Biochem. Pharmacol. 23, 3037 (1974)

KIELHOLZ,P.; und PÖLDINGER,W.:
Pharmaka, Drogenabhängigkeit und Verkehr.
Schweiz. Med. Wschr. 97/1, 1-8
97/2, 49-54 (1967)

KIENLE,G.:
Notfalltherapie neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen.
2. Aufl., Thieme Stuttgart (1968)

KOPMANN,E.; FRANCIS,W.; HUGHES,F.W.:
Potentiating effect of alcohol on tranquilizer and other central depressants.
Arch. gen. Psychiat. 1, 23/7-27/11 (1959)

KUNTZMAN,R.; IKEDA,M.; MACOBSON,M.; CONNEY,A.H.:
A sensitiv method for the determination and isolation of pentobarbital-C^{14} metabolites and its application to in-vitro studies of drug metabolism.
J. Pharm. Exp. Ther. 157, 220-226 (1967)

KUSCHINSKY,G.:
Medikamente und Straßenverkehr.
Deutsches Ärzteblatt 1977-79 (1976)

LAVES,W.:
Zur Pharmakopsychologie von Verkehrsunfällen.
Münch. Med. Wschr. 101, 1427-1430 (1959)

LESLIE,C.A.; GOTTESFELD,Z.; ELLIOTT,A.C.:
Effect of ethanol entry of some substances into the brains of rats.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 49, 833-840 (1971)

LICKINT,F.:
Die Auslösung abnormer Alkoholreaktionen durch Medikamente.
Therapiewoche 7, 414-418 (1957)

LOEWE,S.:
The problem of synergism and antagonism of combined drugs.
Arzneimittel-Forsch. 3, 285-290 (1953)

LOWRY,O.; ROSEBROUGH,N.J.; FARR,A.L.; RANDALL,R.J.:
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

MALLACH,H.J.:
Vortäuschung alkoholbedingter Fahruntauglichkeit durch Arzneimittel.
In: Fehldiagnose Trunkenheit. Hrsg.: Dotzauer,G. und Hirschmann,J.
Schattauer, Stuttgart (1968)

MALLOV,S.; and BAESL,Th.J.:
Effect of ethanol on rates of elimination and metabolism of zoxazolamine, hexobarbital and warfarin sodium in the rat.
Biochem. Pharmacol. 21, 1667-1678 (1972)

MARTIN,Y.C.; and HANSCH,C.:
Influence of hydrophobic character on the relative rate of oxidation of drugs by rat liver microsomes.
J. Med. Chem. 14, 777-779 (1971)

MATSUBARA,T.; BARON,J.; PETERSON,L.L.:
NADPH-cytochrome-P-450-reductase.
Arch. Biochem. Biophys. 172, 463-469 (1976)

MELVILLE,K.I.; JORON,G.E.; DOUGLAS,D.:
Toxic and depressant effects of alcohol given orally in combination with gluthimide or secobarbital.
Tox. Appl. Pharm. 9, 363-375 (1966)

MEYLER,L.:
Side effects of drugs.
Excerpta med. (Amst.) 447-455 (1966)

MEZEY,E.:
Ethanol metabolism and ethanol-drug interaction.
Biochem. Pharmacol. 25, 869-875 (1976)

NETTER,H.J.:
Prinzipien des Arzneimittelabbaues im Organismus.
Arzneimittel-Forsch. 12, 1042-1050 (1962)

PETRUCH,F.; SCHÜPPEL,R.:
Untersuchungen zur unterschiedlichen Hemmwirkung aliphatischer Alkohole auf mikrosomale Enzymsysteme der Rattenleber.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharm. 269, 456 (1971)

PODGAYNY,H.; BRESSLER,R.:
Biochemical basis of the sulfonylurea induced antabuse syndrome.
Diabetes 17, 679-683 (1968)

POLACSEK,E.; BARNES,T.; and TURNER,N.:
Interaction of alcohol and other drugs.
Toronto, Addiction Research Foundation,
Annotated Bibliography I (1970), II (1972)

RAMSEY,H.; HAAG,H.B.:
The synergism between the barbiturates and ethyl alcohol.
J. Pharm. Exp. Ther. 88, 313-322 (1946)

REMMER,H.:
Die Elimination von Arzneimitteln durch enzymatischen Abbau in der Leber.
Internist 7, 413-418 (1966)

REMMER,H.:
Das Schicksal von Arzneimittel im Organismus.
Ärztl. Forsch. 21, 117-128 (1967)

REMMER,H.:
Detoxification of drugs in the liver.
In: Progress and Liver Disease.
Ed.: M.Popper and F. Schaffner,
Academic Press, New York, N.Y. (1968)

REMMER,H.:
Die Entgiftungsfunktion der Leber.
In: Aktuelle Hepatologie, ed. H.A. Kühn und H. Lieber.
Thieme Verlag Stuttgart (1969)

REMMER,H.; SCHENKMAN,J.; ESTABROOK,R.W.; SASAME,H.; GILLETTE,J.; NARASIMHULU,S.; COOPER,D.Y.; ROSENTHAL,O.:
Drug interaction with hepatic microsomal cytochrome.
Mol. Pharmacol. 2, 187-190 (1966)

RUBIN,E.; LIEBER,C.S.:
Alcoholism, alcohol and drugs.
Science 172, 1097 (1971)

RUBIN,E.; LIEBER,C.S.:
Hepatic microsomal enzymes in man and rat:
Induction and inhibition by ethanol.
Science 162, 690-691 (1968)

RUBIN,E.; BACCHIN,P.; GANG,H.; LIEBER,C.S.:
Induction and inhibition of hepatic microsomes and mitochondrial enzymes by ethanol.
Lab. Invest. 22, 569-580 (1970a)

RUBIN,E.; LIEBER,C.S.; GANG,H.; MISRA,P.S.:
Inhibition of drug metabolism by acute ethanol intoxication.
Amer. J. Med. 49, 801-806 (1970b)

SACHS,L.:
Angewandte Statistik.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York,
4. Aufl., pp. 76,316 (1974)

SCHENKMAN,J.B.; REMMER,H.; ESTABROOK,R.W.:
Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome.
Mol. Pharmacol. 3, 113-123 (1967)

SCHENKMAN,J.B.; JANSSON,J.; ORRENIUS,S.; ERNSTER,L.:
A study of the interaction of a series of substituted barbituric acids with the hepatic microsomal monooxygenase.
Arch. Biochem. Biophys. 151, 391-400 (1972)

SCHÜPPEL,R.:
Untersuchungen zur Spezifität Äthanol-bedingter Arzneistoffwechselstörungen.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharm. 260, 197 (1968)

SCHÜPPEL,R.:
Alkohole als Inhibitoren der mikrosomalen N-Demethylierung in vitro.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharm. 264, 302 (1969a)

SCHÜPPEL,R.:
Hemmung der Hydroxylierung von Arzneimitteln in vivo unter Äthanolbelastung.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharm. 265, 156-169 (1969b)

SCHÜPPEL,R.:
Konjugationsreaktionen im Arzneistoffwechsel der Ratte unter akuter Äthanolbelastung.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharm. 265, 233-243 (1969c)

SCHÜPPEL, R.:
Drug metabolism as influenced by ethanol.
In: Toxicological Problems of Drug Combinations.
Proc. XIII, Meeting of the Europ. Soc. for
the Study of Drug Toxicity, Amsterdam,
Exc. med. Found. Int. Congress. Series 254 (1971 a)

SCHÜPPEL, R.:
Wirkungen von Alkohol auf den Arzneistoffwechsel.
In: Alkohol und Leber (Alcohol and liver),
Hrsg. Gerok, W; Sickinger, K.; Hennekenser, H.H.;
Schattauer Verlag, Stuttgart-New York (1971b)

SCHÜPPEL, R.; BREYER, J.; STRELLER, J.; SOEHRING, K.;
Weitere Untersuchungen zum Arzneistoffwechsel
der Ratte unter Äthanolbelastung.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path.
Pharm. 257, 329 (1967)

SCHÜPPEL, R.; PETRUCH, F.:
Zum Mechanismus der Kombinationswirkung von
Barbituraten mit Äthanol.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path.
Pharm. 270, 129 (1971)

SEIDEL, G.:
Verteilung von Pentobarbital, Barbital und
Thiopental unter Äthanol.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path.
Pharm. 257, 221-229 (1967)

SEIDEL, G.; SOEHRING, K.:
Zur Frage der Änderung der Blutalkoholwerte durch
Medikamente.
Arzneimittel-Forsch. 15, 472-474 (1965)

SEIDEL, G.; STRELLER, I.; SOEHRING, K.:
Zur Frage der Beeinflussung des Alkoholgehaltes
im Blut durch Chlorpromazin.
Arzneimittel-Forsch. 14, 412-415 (1964)

SEIXAS, F. A.:
Alcohol and its drug interaction.
Annals of Internal Medicine 83,86-92 (1975)

SITAR, D. S.; MANNERING, G.J.:
Determination of apparent kinetic constants of
the microsomal hydroxylation of amobarbital,
Hexobarbital and Pentobarbital.
Amer. Soc. Pharm. Exp. Ther. 1, Nr. 5, 663-668 (1973)

SOEHRING, K.; SCHÜPPEL, R.:
Wechselwirkungen zwischen Alkohol und Arzneimitteln.
Dtsch. Med. Wschr. 91, 1892-1896 (1966)

SOEHRING, K.; WOLTERS, H.G.:
Pharmakologische Grundlagen der Wirkung von Arzneimitten auf die Verkehrstüchtigkeit.
Hrsg. Wagner, K. und Wagner,H.J.,
Springer Verlag Berlin-Heidelberg (1968)

TOPHAM, J.C.:
Relationship between difference spectra and metabolism.
Biochem. Pharmacol. 19, 1695-1701 (1970)

TORKA, J.:
Cave Meprobamat und Alkoholgenuß.
Münch. Med. Wschr. 103, 896 (1961)

TYGSTRUP, N.; WINKLER, K.; LUNDQUIST, F.:
The mechanism of the fructose effect on the ethanol metabolism of the human liver.
J. Clin. Investig. 44, 817 (1965)

VELDSTRA :
Synergism and potentiation with special reference to the combination of structural analogues.
Pharmacol. Rev. 8, 339-387 (1956)

WAGNER, H.J.:
Einfluß von Medikamenten auf den Acetaldehydspiegel im Blut nach Alkoholzufuhr (enzymatische Bestimmung des Acetaldehyd).
Dtsch. Z. Gerichtl. Med. 46, 70-78 (1957)

WAGNER, H.J.:
Die medikamentöse Beeinflussung der Leistungsfähigkeit und ihre Bedeutung für die Verkehrssicherheit.
Münch. Med. Wschr. 101, 275-282 (1959)

WAGNER, H.J.:
Alkohol, Psychopharmaka und Verkehrstüchtigkeit.
Ärztl. Fortbildung 13, 454 (1963)

WAGNER, K.; WAGNER, H.J.:
Nil nocere. Die Gefahren einer medikamentösen Behandlung von alkoholbeeinflußten Unfallverletzten.
Münch. Med. Wschr. 100, 1923-1925 (1958)

WAHLSTRÖM, G.; WIDERLÖW, E.:
Interaction and acute cross tolerance between ethanol and hexobarbital in the rat.
J. Pharmacy Pharmacol. 23/1, 58-60 (1970)

WALTER, U.:
Über die Beeinflussung des Alkoholgehaltes im Blut durch Arzneimittel.
Dtsch. Z. Ges. Gerichtl. Med. 30, 243-256 (1938)

WEINIG, E.:
Probleme der forensischen Toxikologie.
Dtsch. Z. Ges. Gerichtl. Med. 56, 125-142 (1965)

WEINIG, E.; SCHWERDT, W.:
Alkohol-Barbiturat-Synergismus.
Fortschr. Med. 74, 497-499 (1956)

WHITTLESEY, P.:
The effects of pentobarbital on the metabolism of ethylalcohol in dogs.
Bull. John. Hopk. Hosp. 95, 81-88 (1954)

ZIPF, H.F.; HAMACHER, J.:
Kombinationseffekte.
4. Mitt. Verkehrsmedizinische Probleme des Kombinationseffektes.
Arzneimittel-Forsch. 17, 70-79 (1967)

Lebenslauf

Am 24. Mai 1949 wurde ich, Franz Ludwig Münch, als Sohn des Finanzinspektors Hans Münch und seiner Ehefrau Marianne Münch, geb. Schmid, in Laupheim geboren.

Nach 4-jähriger Volksschulzeit in der Berblinger-Schule in Ulm besuchte ich von 1960 bis 1965 das Humanistische Progymnasium in Lochau bei Bregenz (Österreich). Von 1965 bis 1968 besuchte ich das Humanistische Gymnasium in Bad Wurzach, wo ich am 29. Mai 1968 die Reifeprüfung ablegte.

Vom Wintersemester 1968/69 an studierte ich an der Universität Tübingen Medizin. Dort legte ich am 24. März 1971 die ärztliche Vorprüfung und am 26. Juli 1974 das medizinische Staatsexamen ab.

Als Medizinal-Assistent war ich vom 1. September 1974 bis 31. Dezember 1974 am Toxikologischen Institut der Universität Tübingen und vom 1. Januar 1975 bis 31. Oktober 1975 am Städtischen Krankenhaus in Sindelfingen tätig.

Im November 1975 erhielt ich die Approbation als Arzt. Seit dieser Zeit arbeite ich als Assistenzarzt in der Anaesthesie-Abteilung des Städtischen Krankenhauses in Sindelfingen.

Polyfoto Vogt KG
Forstrasse 58, 7000 Stuttgart 1
Telefon 0711/610641-42

Polyfoto Vogt KG
Forstrasse 58, 7000 Stuttgart 1
Telefon 0711/610641-42